

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Frank Czubayko
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg,
Standort Marburg

**Rekombinante Expression und
Untersuchungen zur Funktion eines
Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindenden Proteins
(FGF-BP)**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Hagenbusch
aus Neustadt an der Weinstraße

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
21.01.2010

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. A. Aigner

1.Korreferent: PD Dr. N. Al-Fakhri

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tumoren und Onkogene	1
1.2	Angiogenese	2
1.3	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs)	4
1.3.1	Eigenschaften von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren	4
1.3.2	Biologische Funktionen von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren	6
1.3.3	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in Neoplasien	7
1.4	Das FGF-Bindeprotein (FGF-BP)	8
1.4.1	Struktur und Eigenschaften von FGF-BP	9
1.4.2	Physiologische Expression von FGF-BP	10
1.4.3	Expression von FGF-BP in Neoplasien	12
1.4.4	Regulation der FGF-BP-Expression durch TPA, EGF, FBS und Retinoide	14
1.4.5	Wirkmechanismus von FGF-BP	16
1.4.6	Rekombinante Expressionssysteme für FGF-BP	18
1.5	Aufgabenstellung und Zielsetzung	20
2	Materialien und Laborgeräte	21
2.1	Laborgeräte	21
2.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.3	Chemikalien	22
2.4	Materialien für die Kultivierung von Zellen	23
2.5	Kits, Enzyme und Marker	23
2.6	Standardlösungen, Puffer und Medien	24
2.7	Zelllinien	28
2.8	Plasmide, Bakterien- und Hefestämme	28
2.9	PCR-Primer	28
2.10	Antikörper	29

3	Methoden	30
3.1	Methoden in der Zellkultur	30
3.1.1	Allgemeine Methoden zur Kultivierung von Zellen	30
3.1.1.1	Kultivierung	30
3.1.1.2	Passagierung	30
3.1.1.3	Zellzahlbestimmung	30
3.1.1.4	Kryokonservierung	31
3.1.2	Transfektion von DNA	31
3.1.2.1	Transiente Transfektion	31
3.1.2.2	Stabile Transfektion	31
3.1.3	Soft-Agar-Assay	32
3.2	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.1	Klonierung	34
3.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.2.1.2	Agarosegel-Elektrophorese	35
3.2.1.3	Phenol-Chloform-Extraktion von DNA	35
3.2.1.4	Restriktion von DNA	36
3.2.1.5	Dephosphorylierung restringierter (linearisierter) Plasmid-DNA	37
3.2.1.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	37
3.2.1.7	Ligation	38
3.2.1.8	Transformation von Escherichia coli	38
3.2.1.9	Kultivierung und Kryokonservierung transformierter Bakterien	38
3.2.1.10	Colony Lift	39
3.2.2	Präparation und Analyse von Plasmid-DNA	40
3.2.2.1	Qiagen Mini-prep Plasmidisolation	40
3.2.2.2	NUCLEOBOND Midi-prep Plasmidisolation	40
3.2.2.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	41
3.2.2.4	DNA-Sequenzierung	41
3.3	Protein- und immunchemische Methoden	42
3.3.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.3.1.1	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	43
3.3.1.2	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Silverstain)	43
3.3.1.3	Gelkonservierung	44

3.3.2	Western-Blot	44
3.3.2.1	Filmentwicklung	46
3.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
3.3.4	Liganden-Dot-Blot	46
3.3.5	Immunhistochemische Färbung von paraffin-fixierten Ovarial- gewebeschnitten	47
3.3.6	Immunfluoreszenz von ERGIC in COS7-Zellen bzw. FGF-2 in SW13-Zellen	49
3.4	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	50
3.5	Expression von FGF-BP in <i>Pichia pastoris</i>	51
3.5.1	Das Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i> /pPIC9k	51
3.5.2	Herstellung kompetenter <i>Pichia pastoris</i> Zellen	52
3.5.3	DNA-Linearisierung	53
3.5.4	Transformation und Selektionierung von <i>Pichia pastoris</i> Zellen	53
3.5.5	Kulturen und Expression	54
3.5.6	Kryokonservierung	54
3.5.7	Affinitätsreinigung und Anreicherung von FGF-BP aus <i>Pichia</i> <i>pastoris</i>	54
3.5.7.1	Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose	54
3.5.7.2	Affinitätsreinigung über Heparin-Sepharose	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Expression von FGF-BP in Ovarialkarzinomen	56
4.2	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und biologischen Funktion verschiedener FGF-BP-Konstrukte in Abhängigkeit von der Expression nukleärer Fibroblasten-Wachstumsfaktoren	59
4.2.1	Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP in COS7-Zellen mit bzw. ohne Expression von FGF-2	59
4.2.2	Kolokalisation von FGF-BP und ERGIC in COS7-Zellen	63
4.2.3	Einfluss von N- bzw. C-terminalen Verkürzungen auf die intrazelluläre Verteilung von FGF-BP	65
4.2.4	Biologische Aktivität von FGF-BP und verschiedener FGF-BP- Verkürzungsmutanten in COS7-Zellen	68

4.2.5	Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP in endogen FGF-2-exprimierenden SW13-Zellen	69
4.2.6	Biologische Aktivität von FGF-BP und verschiedener FGF-BP-Verkürzungsmutanten in SW13-Zellen	70
4.3	Herstellung und Charakterisierung von rekombinatem FGF-BP (rFGF-BP) in <i>Pichia pastoris</i>	72
4.3.1	Etablierung der FGF-BP-Expression	72
4.3.2	Anreicherung von FGF-BP aus dem Expressionsmedium	75
4.3.3	FGF-BP-Signaldetektion im Western Blot mit verschiedenen Antikörpern	77
4.3.4	Untersuchung der FGF-BP-Proteinstabilität in Abhängigkeit von Temperatur und Proteaseinhibition	79
4.3.5	Liganden-Dot-Blot mit FGF-BP und verschiedenen FGFs	80
4.3.6	Nachweis der biologischen Aktivität des rekombinaten FGF-BP in SW13- Zellen	80
5	Diskussion	83
6	Zusammenfassung	91
7	Abkürzungsverzeichnis	93
8	Literaturverzeichnis	95
9	Danksagung	106
10	Verzeichnis akademischer Lehrer	107

1 Einleitung

1.1 Tumoren und Onkogene

Maligne Tumorerkrankungen sind in den Industriestaaten nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Landis et al., 1999). Neben der operativen Therapie wird je nach Tumorart und Ausdehnung auch die Chemo- und Strahlentherapie angewandt. Die Erfolgsaussichten sind jedoch gerade bei fortgeschrittenen, metastasierten Tumorerkrankungen begrenzt. Ein in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnener therapeutischer Ansatz verfolgt die spezifische Inhibierung von Wachstumsfaktoren, um die Tumorausbreitung zu begrenzen. Dementsprechend ist das Verständnis der Steuerung dieser wachstums-stimulierenden Faktoren von zentraler Bedeutung im Hinblick auf die gezielte, möglichst nebenwirkungsarme Therapie von malignen Tumoren.

In gesunden Geweben befindet sich nur ein geringer Teil der Zellen im Proliferationsstadium. Diese sogenannte Wachstumsfraktion ersetzt den physiologischen Zellverschleiß und geht aus gewebetypischen Stammzellen hervor. Tumorstadium entsteht durch einen multifaktoriellen Prozess, bei dem der Kontrollverlust über die Proliferation einer Zelle im Vordergrund steht. Die beschleunigte Zellteilung einer solchen maligne entarteten Zelle führt zur Bildung eines mikroskopisch kleinen Tumors. Um sich zu einem klinisch manifesten, d.h. makroskopischen Tumor zu entwickeln, müssen die transformierten Zellen in der Lage sein, sich dem Immunsystem zu entziehen und ihre Versorgung durch die Induktion der Gefäßneubildung (Angiogenese) sicherzustellen. Einige Tumoren erlangen in späteren Stadien ihrer Entwicklung die Fähigkeit, von ihrer initialen Lokalisation ausgehend andere Organe zu besiedeln und sich dort zu manifestieren (Metastasierung). Diese Prozesse wie onkogene Transformation, Umgehung des Immunsystems, Angiogenese und Entwicklung eines metastatischen Potentials sind assoziiert mit genetischen Veränderungen.

Wichtige Regulatoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung in einem Organismus sind sog. Protoonkogene. Durch Veränderungen wie Punktmutation, Amplifikation oder chromosomale Translokation können aus ihnen Onkogene entstehen, eine Gruppe von „Krebsgenen“. Ihre Produkte sind Onkoproteine, die unter anderem für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Proteinkinasen,

Apoptose-Regulatorproteine, G-Proteine und Transkriptionsfaktoren kodieren und somit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktionskaskade spielen. Dies gilt auch für Moleküle, die für DNA-Reparatur, Regulation des Zellzyklus und Vermittlung von Apoptose, Metastasierung und Gewebeinvasion verantwortlich sind. Diese Gene und deren Produkte manifestieren sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie, die zusammengenommen zu malignem Zellwachstum führen: Überproduktion und/oder unkontrollierte Wirkung von Wachstumsfaktoren, Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren, Zellimmortalisierung durch Störung der Apoptose, unbegrenztes Wachstumspotential, Invasion und Metastasierung durch Verlust von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation sowie die Induktion von Gefäßneubildung mit Aufbau eines tumoreigenen Gefäßnetzes (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese sechs Fähigkeiten besitzen die meisten, wenn nicht sogar alle humanen soliden Tumoren.

1.2 Angiogenese

Entscheidend für das Überleben und die Funktionen einer Zelle ist deren Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie der Abtransport toxischer Metabolite. Angiogenese bezeichnet den Prozess der Generierung neuer kapillärer Blutgefäße. Dabei handelt es sich um einen streng regulierten Prozess, bei dem ruhende Endothelzellen zum Abbau von Extrazellulärmatrix und Basalmembran angeregt werden, um in das Interstitium zu migrieren und durch Proliferation tubuläre Strukturen zu organisieren.

In adulten Geweben ist die Endothelproliferationsrate verglichen mit vielen anderen Zelltypen sehr niedrig und es findet weitgehend keine Neovaskularisierung statt. Physiologische Ausnahme ist die zeitlich begrenzte und kontrollierte Angiogenese im Verlauf des weiblichen Reproduktionsszyklus sowie bei Wundheilungsprozessen (Hyder und Stancel, 1999). Unregulierte Angiogenese findet sich bei vielen pathologischen Vorgängen (Folkman, 1995), insbesondere im Rahmen von Tumorstadium und Metastasierung (Hanahan, 1998).

Mit zunehmendem Tumorstadium entfernen sich die Zellen von der versorgenden Kapillare. Der Tumor erreicht den Zustand des „steady-state“, wobei die Zahl der neu gebildeten Zellen der der absterbenden Zellen entspricht. Die Tumormasse nimmt

dann nicht mehr zu, was durch die mangelnde Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff verursacht wird (Gasparini, 1999). Die meisten soliden, nicht-vaskularisierten Tumoren erreichen mit einem maximalen Durchmesser von 2 mm nur eine mikroskopische Größe und können für mehrere Jahre unentdeckt bleiben. Metastasen sind mit diesen avaskulären Tumoren kaum assoziiert. Nach einigen Monaten oder Jahren kann ein solcher Tumor die Fähigkeit zur Induktion der Angiogenese entwickeln und wird dann als Angiogenese-Phänotyp bezeichnet. Dieser Phänotyp kann sich durch Produktion von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise acidic FGF (aFGF, FGF-1), basic FGF (bFGF, FGF-2) (Baird und Klagsbrun, 1991), VEGF (vascular endothelial growth factor), (Kim et al., 1993), HGF (hepatocyte growth factor) (Weidner et al., 1993), EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor α) (Schreiber et al., 1986) oder Pleiotrophin (PTN) (Fang et al., 1992) und/oder der verringerten Wirkung negativer Angiogenesemodulatoren wie Angiostatin (O'Reilly et al., 1996; O'Reilly et al., 1994) und Endostatin (O'Reilly et al., 1997) entwickeln.

Sowohl bei der physiologischen wie auch bei der pathologischen Angiogenese ist die Hypoxie der Hauptinduktor für die Initiation des Angiogeneseprozesses. Die Entwicklung eines Tumors zum Angiogenese-Phänotyp wird durch die steigende Hypoxie mit zunehmendem Abstand der Tumorzellen von der versorgenden Kapillare induziert. Auch einige Onkogene wie v-ras, k-ras, v-raf, src, fos, v-yes (Jiang et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 1995; Okada et al., 1998) können die Zunahme von Angiogenesefaktoren wie VEGF durch Induktion ihrer Expression fördern und steigern die Produktion von Zytokinen und proteolytischen Enzymen (Arbiser et al., 1997). Onkogenprodukte können auch direkt als Angiogenesefaktoren wirken (Talarico und Basilico, 1991).

Das Ausmaß der Angiogenese in einem Primärtumor, gemessen als Mikrogefäßdichte, scheint in direktem Zusammenhang mit der Metastasierungsrate vieler solider Tumoren zu stehen. Eine direkte positive Korrelation zwischen Blutgefäßdichte in Primärtumoren und ihrer Neigung zur Metastasenbildung wurde für verschiedene Tumortypen dokumentiert, wie für das invasive Mammakarzinom (Toi et al., 1993; Weidner et al., 1991), das Bronchialkarzinom (Macchiarini et al., 1992) und Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Gasparini et al., 1993). In diesen

Studien war das Ausmaß der Tumorangiogenese ein unabhängiger Prognoseindikator für die Entwicklung der Krankheit, da die Neovaskularisierung von Primärtumoren entarteten Zellen das Eintreten in den Blutkreislauf ermöglicht und damit die Grundlage für eine lokale und (fern)metastatische Expansion bildet. Die meisten Mikrometastasen sind nicht-vaskularisiert und gehen zugrunde, einige allerdings entwickeln sich zum Angio-genese-Phänotyp (Folkman, 1995) und verschlechtern drastisch die Prognose des Patienten.

1.3 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs)

Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) besteht aus einer Gruppe von 23 verwandten Wachstumsfaktoren, die eine Molmasse von 17-34 kDa besitzen. Definierende Eigenschaften dieser Familie sind eine starke Affinität zu Heparin und heparinähnlichen Glykosaminoglykanen (HLGAGs) (Burgess und Maciag, 1989), sowie ein Zentrum von 140 Aminosäuren, welches hochgradig homolog zwischen den einzelnen Mitgliedern ist. Obwohl alle FGFs durch ihre Struktur kategorisiert sind, hat die historische Nomenklatur ihren Ursprung in der Tatsache, dass die ersten Mitglieder der FGF-Familie die Proliferation von Fibroblasten stimulieren (Gospodarowicz, 1974). Die Bezeichnung FGF ist in sofern irreführend, dass einige FGFs ein breiteres mitogenes Spektrum aufweisen – so stimulieren sie die Proliferation von Zellen sowohl mesodermalen als auch ektodermalen und endodermalen Ursprungs (Basilico und Moscatelli, 1992; Ornitz und Itoh, 2001). Die einzige bislang bekannte Ausnahme ist FGF-7, welches ausschließlich auf epitheliale und nicht auf endotheliale Zellen oder Fibroblasten mitogen wirkt (Rubin et al., 1989).

1.3.1 Eigenschaften von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Die meisten FGFs (FGFs 3-8, 10, 15, 17-19, 21-23) besitzen ein aminoterminal lokalisiertes Signalpeptid und werden auf dem klassischen Weg via Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat sezerniert. FGF-9, -16 und -20 werden trotz Fehlen eines solchen Signalpeptids ebenfalls sezerniert (Miyake et al., 1998; Miyamoto et al., 1993; Ohmachi et al., 2000). FGF-9 enthält aminoterminal eine hydrophobe Sequenz, die für seine Sekretion verantwortlich ist (Miyakawa et al., 1999; Revest et al., 2000). Eine andere Gruppe von FGFs ohne Signalsequenz (FGF-

11,-12,-13,-14) entfaltet ihre Wirkung ausschließlich intrazellulär (Munoz-Sanjuan et al., 2000; Smallwood et al., 1996; Wang et al., 2000; Yamamoto et al., 1998). FGF-1 und -2 fehlt ebenfalls eine Signalsequenz, sie finden sich jedoch auf Zelloberflächen und in der Extrazellulärmatrix. Die Sezernierung dieser FGFs scheint unabhängig vom ER und dem Golgi-Apparat über einen alternativen Mechanismus zu erfolgen.

Da FGF-2 (basic FGF, bFGF) besonders relevant ist im Hinblick auf das FGF-Bindeprotein (FGF-BP), wird es im Folgenden detaillierter beschrieben.

FGF-2 wurde initial als 15kDa großes heparinbindendes Protein aus Rinderhirnextrakt isoliert (Gospodarowicz, 1975). Später stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Protein um ein Proteolyseprodukt einer primär 18kDa großen Form handelt (Bikfalvi et al., 1997). Zu dieser 18kDa-Form existiert FGF-2 zusätzlich in 4 verschiedenen höhermolekularen Isoformen (22.5, 23.1, 24.2 kDa) (Florkiewicz und Sommer, 1989). Während die Translation der 18kDa Form am konventionellen AUG-Codon beginnt, resultieren die Isoformen aus alternativen Translations-Initiationen (CUG-Codons in-frame vor dem AUG-Codon) (Arnaud et al., 1999). Das Hauptstrukturmerkmal der höhermolekularen Formen ist die Präsenz einer Nukleus-lokalisierenden Sequenz (NLS), die diese Wachstumsfaktoren in den Zellkern dirigiert. Die 18kDa-Form von FGF-2 ist dagegen im wesentlichen im Zytosol lokalisiert (Bugler et al., 1991; Renko et al., 1990). Die biologische Funktion der unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der Isoformen ist noch unklar.

Obwohl keine der FGF-2-Isoformen eine Signalsequenz besitzt, konnte für verschiedene Zelltypen, die die 18kDa-Form von FGF-2 exprimieren, gezeigt werden, dass dieser Wachstumsfaktor in den Extrazellulärraum durch einen bisher unbekannten Mechanismus sezerniert werden kann (Jouanneau et al., 1997; Mignatti et al., 1991). Die Freisetzung von FGF-2 gelingt durch passive Prozesse wie Zelltod oder -verletzung (McNeil et al., 1989) sowie durch Induktion einer FGF-2-Sekretion durch z.B. Fibrinolyseprodukte (Lorenz et al., 1992). Durch die Aktivierung spezifischer Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt FGF-2 als para- und autokriner Wachstumsfaktor seine Wirkung. Mignatti et al. zeigten jedoch, dass die Migration einer isolierten Zelle, die FGF-2 exprimiert, durch FGF-2-neutralisierende Antikörper gehemmt wird (Mignatti et al., 1991). Dementsprechend kann ein anderer Mechanismus als der Zelltod zur Freisetzung von FGF-2 führen. Da die FGF-2-abhängige Zellmigration nicht durch Blockierung des klassischen Sekretionswegs via

ER und Golgi-Apparat inhibiert werden konnte, scheint es einen alternativen Mechanismus zur Freisetzung des Proteins zu geben (Mignatti et al., 1992), in den FGF-BP als Carrierprotein involviert sein könnte.

Bisher sind drei Typen von Bindepartnern bekannt, mit denen FGFs interagieren: Heparinsulfatproteoglykane (HSPGs) (Ornitz, 2000), FGF-Bindeproteine (FGF-BPs) (Tassi et al., 2001; Wu et al., 1991) sowie transmembrane FGF-Rezeptoren (FGFRs) aus der Tyrosinkinasefamilie, die für die Signaltransduktion verantwortlich sind (Givol und Yayon, 1992; Ornitz et al., 1996). Die Bindung der FGFs an Heparin bzw. HSPGs schützt sie zum einen vor ihrer Degradation, so z. B. FGF-1 vor der Proteolyse durch Thrombin (Lobb, 1988) und FGF-2 durch Trypsin (Sommer und Rifkin, 1989) oder Plasmin (Saksela et al., 1988). Zum anderen entsteht dadurch ein lokales Reservoir für FGFs, wodurch deren Freisetzung und damit Bioaktivität kontrolliert wird.

1.3.2 Biologische Funktionen von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

FGFs spielen vielfältige Rollen bei der Angiogenese, embryonalen Entwicklung, Regulation von Zellproliferation, -migration und -differenzierung sowie bei der Pathogenese von Karzinomen (Abud et al., 1996; Goldfarb, 1996; Presta et al., 1986; Wiedlocha und Sorensen, 2004). Einige FGFs werden ausschließlich während der Embryogenese exprimiert (z.B. FGF-4,-8,-15,-17,-19), während andere in embryonalem und adultem Gewebe exprimiert werden (z.B. FGF-1,-2,-5,-7,-9,-11,-12,-13,-14,-16,-18,-20,-23) (Ornitz und Itoh, 2001).

Während der Embryogenese nehmen FGFs unter anderem eine zentrale Stellung bei der Organogenese ein, insbesondere bei der Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems und der Extremitäten (Cohn et al., 1995; Crossley et al., 1996; Yoshimura et al., 2001). FGFs induzieren die Zellteilung von Embryonalgewebe im Mausembryo (Chai et al., 1998) und sind durch FGF-5 bei der Regulation der Gastrulation beteiligt (Crossley et al., 1996; Hebert et al., 1991). FGF-8 ist mitverantwortlich für die Entwicklung des Mittelhirns (Crossley et al., 1996) und FGF-3 ist essentiell für die Induktion der Entwicklung des Innenohrs (Represa et al., 1991). Durch die Vermittlung der Differenzierung des Lungenepithels nimmt FGF-10

eine Schlüsselstellung bei der Lungenentwicklung ein (Sekine et al., 1999; Warburton et al., 1999).

Fehlendes Vorhandensein verschiedener FGFs äußert sich in vielfältigen Abnormalitäten. Durch Knockoutstudien an Mäusen konnte die essentielle Bedeutung verschiedener FGFs wie FGF-4, FGF-8 und FGF-10 für die Mausentwicklung und Lungenformation gezeigt werden. So sind z.B. Mutationen im Sinne von FGF-4/- (Feldman et al., 1995) und FGF-8/- (Sun et al., 1999) embryonal letal. FGF-10-defiziente Mäuse sterben bei der Geburt aufgrund der insuffizienten Lungenausbildung (Sekine et al., 1999). FGF-2- bzw. FGF-6-defiziente Mäuse dagegen sind nicht nur lebensfähig, sondern auch phänotypisch von Wildtypmäusen nicht zu unterscheiden (Fiore et al., 1997; Ortega et al., 1998). Demnach scheinen einige Familienmitglieder in der Lage zu sein, die Funktionen anderer ersetzen zu können. Dies trifft zumindest für die FGF-2-vermittelte Angiogenese zu (Ortega et al., 1998), allerdings nicht für die FGF-2-abhängige Regulation des vaskulären Tonus, da FGF-2-defiziente Mäuse einen niedrigeren arteriellen Mitteldruck als Wildtypmäuse aufweisen (Dono et al., 1998; Zhou et al., 1998). Im Hunde- (Yanagisawa-Miwa et al., 1992) als auch im Schweinmodell (Watanabe et al., 1998) konnte die Bedeutung von FGFs für die Regeneration infarzierten Myokards nachgewiesen werden.

1.3.3 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in Neoplasien

FGFs können das Tumorwachstum als Mitogene, Induktoren der Angiogenese sowie Inhibitoren der Apoptose unterstützen. Dabei werden diese wachstumsfördernden Eigenschaften nicht durch Mutationen in den FGFs selbst vermittelt, sondern durch deren Überexpression bzw. aufgrund ihrer gesteigerten Verfügbarkeit durch Freisetzung intrazellulärer und Mobilisation extrazellulär gebundener FGFs. Die Überexpression der FGFs erfolgt durch die Tumorzellen selbst oder durch stromale, nicht-transformierte Zellen. Zunächst können die Tumorzellen selbst ohne externes Signal FGFs als auto- und parakrine Wachstumsfaktoren sezernieren, wie es für FGF-2 in humanen Gliomen beschrieben wurde (Takahashi et al., 1990). Die Sekretion von FGFs kann auch als Reaktion auf ein Signal der Tumorzellen aus stromalen, nicht-transformierten Zellen erfolgen, wie im Falle von FGF-5 in Pankreaskarzinomen (Kornmann et al., 1997). Zudem besteht die Möglichkeit der FGF-Sekretion durch Tumorzellen als Antwort auf ein Signal von nicht-

transformierten Zellen. Letzteres wurde für FGF-2 bezüglich des Kaposi-Sarkoms beschrieben. Kaposi-Sarkome sind charakterisiert durch inflammatorische Zellinfiltrate, wobei $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und $\text{INF-}\gamma$ durch aktivierte T-Lymphozyten freigesetzt werden. Als Antwort auf diese Zytokine produzieren die Tumorzellen vermehrt FGF-2 (Samaniego et al., 1998).

Neben der Überexpression der FGFs kann das Wachstum von malignen Tumoren auch durch die erhöhte Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren durch deren Mobilisation aus der Extrazellulärmatrix induziert werden. Zum einen gelingt dies durch die enzymatische Spaltung der HSPGs durch Heparinasen und Proteasen, was in mehreren Studien beschrieben wurde (Bashkin et al., 1989; Moscatelli, 1992; Vlodavsky et al., 1988). Durch Regulation der Expression der Heparinasen können Tumoren in der Lage sein, FGFs aus der extrazellulären Matrix zu mobilisieren. So korreliert die Überexpression der Heparinasen interessanterweise mit dem invasiven Phänotyp einiger humaner Mammakarzinom-Zelllinien (Hulett et al., 1999; Vlodavsky et al., 1999).

Ein alternativer Mechanismus für die Regulation der FGF-Freisetzung aus der Extrazellulärmatrix beruht auf einem FGF-Bindeprotein (FGF-BP), welches als Carrierprotein für FGF-1 und FGF-2 an deren Funktion beteiligt ist.

1.4 Das FGF-Bindeprotein (FGF-BP)

Das FGF-Bindeprotein (FGF-BP) wurde erstmals von Wu et al. 1991 als 17 kDa großes, Heparin-bindendes Protein (HBp17) beschrieben, welches aus mit A431 humanen Epidermoidkarzinomzellen konditioniertem, serumfreien Kulturmedium isoliert wurde. Im Gegensatz zu $\alpha 2$ -Makroglobulin ist FGF-BP in der Lage, FGF-1 und FGF-2 nicht-kovalent und reversibel zu binden. Ebenso ist eine Bindung von FGF-BP an heparinähnliche Glykosaminoglykane (HLGAGs) bekannt (Wu et al., 1991). Über die Ausbildung dieser Bindungen ist ein Lösen der Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix und gleichzeitig deren Schutz vor der Degradation möglich (Czubayko et al., 1994; Rak et al., 2002). Diese Charakteristika sprechen für eine wichtige Rolle des FGF-BP bei der Mobilisierung von FGFs aus der Extrazellulärmatrix und die damit verbundene Aktivierung der Wachstumsfaktoren *in vivo*. Zudem wurden Interaktionen von FGF-BP mit FGF-7, -10 und -22 (Beer et al., 2005; Czubayko et al., 1994) beobachtet.

1.4.1 Struktur und Eigenschaften von FGF-BP

Lametsch et al. (2000) charakterisierten die strukturellen Eigenschaften von bovinem FGF-BP, welches aus präpartalem Brustdrüsensekret durch Heparin-Affinitätschromatographie gewonnen wurde.

Das unprozessierte bovine FGF-BP besteht aus 234 Aminosäuren und beinhaltet eine Signalsequenz für die Sekretion. Die Aminosäuresequenz zeigt eine signifikante Ähnlichkeit mit dem humanen (60%) und dem FGF-BP der Maus (53%). Mit Hilfe der matrixunterstützten Laserdesorptionsionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) wurde gezeigt, dass alle zehn Cysteine, die im FGF-BP von Mensch, Maus und Rind konserviert sind, untereinander Disulfidbrücken ausbilden (Cys71-Cys88, Cys97-Cys130, Cys106-Cys142, Cys198-Cys234, Cys214-Cys222). Das bovine FGF-BP ist an Asn155 N- und an Ser172 O-glykosyliert. Während beim humanen und dem FGF-BP der Maus keine entsprechende N-Glykosylierung existiert, ist die O-Glykosylierungsstelle bei Mensch und Maus konserviert (Lametsch et al., 2000). Lametsch et al. stellten beim bovinen FGF-BP zwei alternative N-terminale Aminosäuren Gly32 und Ser52 fest (Lametsch et al., 2000), wohingegen das humane FGF-BP mit Lys34 beginnt (Wu et al., 1991). Dafür könnten Subtilisin-ähnliche Endopeptidasen verantwortlich sein, die bei dibasischen Motiven, die es im humanen FGF-BP nicht gibt, schneiden und prozessieren.

Wang et al. identifizierten die Heparinbindungsstelle von FGF-BP als eine aus 34 Aminosäuren bestehende Sequenz (Aminosäuren 110-143) (Wang et al., 1998). Hierbei scheint der hohe Anteil basischer Aminosäuren die Bindungsspezifität für Heparin zu vermitteln (Lametsch et al., 2000). Zusätzlich zu dieser stark basischen Region fanden Mongiat et al. zwei Regionen, die teilweise mit Konsensussequenzen, die von Cardin et al. durch Vergleich von 21 heparinbindenden Proteinen ermittelt wurden (Cardin und Weintraub, 1989), übereinstimmen (Lys25-His32 bzw. Lys163-Ser169) (Mongiat et al., 2001). Besonders erwähnenswert hierbei ist die Sequenz Lys25-His32, die als Teil der N-terminalen Signalsequenz während des Sekretionsprozesses vom unprozessierten FGF-BP getrennt wird.

Xie et al. lokalisierten die FGF-Bindungsstelle des FGF-BP im Bereich dessen C-Terminus (Aminosäuren 193-234) (Xie et al., 2006), die sich damit deutlich von der Heparin-Bindungsstelle (s.o.) unterscheidet.

Bezüglich des Molekulargewichts des isolierten FGF-BP ergaben sich Diskrepanzen. Die aufgrund der Aminosäuresequenz zu erwartende Größe des gereinigten bovinen FGF-BP von 22,5 kDa wurde weder bei der Massenspektrometrie (28,6 kDa) noch bei der SDS-Gel-Elektrophorese (36 kDa) bestätigt (Lametsch et al., 2000). Auch Wu et al. fanden beim humanen FGF-BP Unterschiede zwischen errechneter (22,7 kDa) und durch SDS-Gel-Elektrophorese beobachtete Größe (17kDa), was sie auf proteolytische Prozesse am C-Terminus zurückführten (Wu et al., 1991). Letztlich konnten die Unterschiede zwischen den errechneten und beobachteten Größen nicht vollständig geklärt werden. Zudem gibt es Studien, die auf eine Dimerbildung von FGF-BP schließen lassen. (Aigner et al., 2001; Rak und Kerbel, 1997; Sauter et al., 2001).

1.4.2 Physiologische Expression von FGF-BP

Gesundes, adultes humanes Gewebe scheint keine FGF-BP-mRNA zu exprimieren (Czubayko et al., 1994), allerdings finden sich erhöhte Expressionsraten von FGF-BP während der Embryogenese, der Regeneration von Geweben und bei der Wundheilung.

Kurtz et al. untersuchten mittels Northern-Blots Gewebe von prä-, postnatalen und adulten Mäusen auf das Vorkommen von FGF-BP-mRNA (Kurtz et al., 1997). Die Expression von FGF-BP-mRNA während der Embryogenese beschränkt sich dabei auf Haut, Darm und Lunge. Während in der sich entwickelnden Haut sowie im Darm die Expression der FGF-BP-mRNA am Tag 9 beginnt, perinatal am höchsten ist und postnatal abnimmt, konnten hohe Expressionsraten der FGF-BP-mRNA in Lunge und Ovar auch in adulten Tieren nachgewiesen werden. Aigner et al. konnten diese Beobachtungen durch immunhistochemische Studien an Mäusen erweitern. Sie fanden eine breite Expressionsverteilung von FGF-BP in vielen Geweben zwischen Tag 8 und Tag 16 der Embryogenese. FGF-BP wurde dabei im Verdauungssystem, Thymus, Haut, Haarfollikeln, Zahnleiste, Respirationstrakt, verschiedenen Drüsengeweben, Niere, Leber und einigen Regionen des ZNS detektiert, wobei sich die Immunreaktivität hauptsächlich in primitiven Epithelien manifestierte. Unterschiedliche Intensitäten bei der Immunfärbung verschiedener Gewebe und Organe sprachen für unterschiedlich hohe Expressionsraten von FGF-BP. Starke Färbungen fanden sich in Thymus, Haut, Niere, Respirationstrakt,

Gastrointestinaltrakt und Mundhöhle. Zudem ist die Expression des Proteins abhängig vom Stadium der Differenzierung: Mit der Weiterentwicklung von Leber, einigen ZNS-Regionen und Herz sinkt die Expression von FGF-BP, wohingegen die Expression des Proteins mit zunehmender Entwicklung der Mundhöhle steigt (Aigner et al., 2002a). Diese Daten implizieren eine streng regulierte Expression von FGF-BP während der Embryonalentwicklung.

Beim Vergleich der Expressionsraten von FGF-BP und FGF-2 während der Embryogenese der Maus fanden sich starke Immunreaktionen für beide Proteine in Haut, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Niere, Pankreas und verschiedenen Drüsengewebe sowie schwache Immunreaktionen beider Proteine in Skelett- und Herzmuskel. Im Gegensatz dazu wurden in der Leber deutlich stärkere Expressionsraten von FGF-BP im Verhältnis zu FGF-2 beobachtet (Aigner et al., 2002a).

Bei einigen nicht-malignen Erkrankungen wurden im Rahmen der Geweberegeneration Änderungen bezüglich der FGF-BP-Expression beschrieben. So treten nach einigen Nierenerkrankungen bei Kindern erhöhte Expressionsraten von FGF-BP im Rahmen der Geweberegeneration hauptsächlich in renalen Tubulusepithelien auf. Dies konnte für die HIV-assoziierte Nephropathie als auch für das durch bakterielle Toxine ausgelöste hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) gezeigt werden. Zudem fand sich im Urin dieser Patienten sekretiertes FGF-BP (Liu et al., 2001). Im Gegensatz zu der längerfristig erhöhten Expression von FGF-BP nach renalen Erkrankungen erhöht sich die Expressionsrate von FGF-BP bei der Wundheilung vergleichsweise kurz: Nach Verletzungen der Haut steigt die Expression innerhalb weniger Stunden an und sinkt auf das Ausgangsniveau nach etwa 2 Tagen mit Verschluss der Wunde ab (Kurtz et al., 1997).

FGF-BP interagiert mit FGF-7 und FGF-10, die eine wichtige Rolle bei der Regeneration verletzter Epithelien spielen, sowie mit FGF-22. Diese Interaktionen führen zu einer gesteigerten Aktivität der Liganden trotz ihrer niedrigen Konzentration. Die Affinität von FGF-BP zu FGF-7 und FGF-10 spricht dafür, dass eine Hochregulation der FGF-BP-Expression nach Epithelverletzungen die Aktivität dieser FGFs erhöht, was den Prozess der Wundheilung fördert (Beer et al., 2005).

1.4.3 Expression von FGF-BP in Neoplasien

Die Expression von FGF-BP in neoplastischen Zellen ist streng reguliert und gewebespezifisch. FGF-BP konnte bei Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Ursprungs nachgewiesen werden, so bei Lunge, Harnblase, Haut, Zervix als auch in humanen Keratinozyten. Auch in Gewebeproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region wurde eine gesteigerte Synthese der mRNA des FGF-BP gefunden (Czubayko et al., 1994). Die positive Korrelation von Gefäßdichte und FGF-BP-positiven Plattenepithelkarzinomen signalisiert die Bedeutung von FGF-BP als möglichen Angiogenesefaktor (Li und Chen, 2004).

Eine gesteigerte Expression von FGF-BP auf mRNA- und Proteinebene konnte auch in Kolonadenomen, sowie in primären und metastatischen kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden. Gleiches gilt für Pankreatitiden, intraepitheliale Neoplasien und Adenokarzinome des Pankreas (Tassi et al., 2006), als auch für das invasive humane Mammakarzinom (Kagan et al., 2003).

Czubayko et al. transfizierten die humane Nebennierenkarzinom-Zelllinie SW13 mit einem Expressionsvektor für FGF-BP. Diese nicht-tumorigene Zelllinie exprimiert FGF-2, jedoch kein FGF-BP. Die FGF-BP-Expression führte zu einer vermehrten Sekretion von biologisch aktivem FGF-2 und induzierte die Koloniebildung im Soft-Agar-Assay sowie das Wachstum vaskularisierter Tumoren in athymischen Nacktmäusen (Czubayko et al., 1994). Um die zeitliche Verteilung von FGF-BP während verschiedener Phasen des Tumorwachstums zu untersuchen, wurde ein tetracyclin-reguliertes Expressionssystem in SW13-Zellen verwendet (Liaudet-Coopman et al., 1996). Es wurden SW13/tetBP Zellen generiert und in athymische Nacktmäuse xenotransplantiert. Die Expression von FGF-BP in den entstehenden Tumoren konnte durch die Behandlung der Mäuse mit Tetracyclin reguliert werden. Während der frühen Stadien der Tumormorphogenese scheint das Wachstum der xenotransplantierten Zellen entscheidend von der FGF-BP-Expression abzuhängen, die für die weitere Tumorexpansion keine signifikante Bedeutung zu haben scheint (Liaudet-Coopman et al., 1996).

Durch Ribozym-Targeting wurde die Expression von endogenem FGF-BP in einer humanen Zervix- und einer Kolonkarzinom-Zelllinie (ME-180 und LS174T) unterbunden. Daraus resultierte eine verminderte Freisetzung von biologisch aktivem FGF-

2 durch die Zellen sowie die Reduktion von Angiogenese und Tumorwachstum von xenotransplantierten Tumoren in Nacktmäusen (Czubayko et al., 1997). Die ebenfalls Ribozym-vermittelte Reduktion von FGF-BP in metastasierenden Prostatakarzinomzellen (PC-3) führte zu einer Wachstumsreduktion der Zellen in vitro und verhinderte die Fähigkeit dieser hochmetastatischen Zellen Tumoren in vivo zu generieren (Aigner et al., 2002b).

Da FGF-BP in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen, normalen humanen Keratinozyten, während der murinen Hautentwicklung und in Kolonkarzinomen exprimiert wird (Czubayko et al., 1994; Kurtz et al., 1997; Tassi et al., 2001; Wu et al., 1991), wurde die Bedeutung von FGF-BP für die Karzinogenese der Haut und des Kolons näher untersucht.

Kurtz et al. analysierten die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen anhand von auf immundefiziente Mäuse xenotransplanterter humaner Haut, die mit einem Karzinogen (DMBA) behandelt wurde. Makroskopisch sichtbare Veränderungen in Form eines Papilloms konnten nach 6-wöchiger Behandlung mit dem Karzinogen auf der Haut der Mäuse beobachtet werden, jedoch nicht bei der xenotransplantierten humanen Haut. Bei der immunhistochemischen Analyse der humanen Haut fanden sich allerdings p53-positive Keratinozyten in der Epidermis, eine gesteigerte Angiogenese in der Dermis, verstärkte Proliferation von Keratinozyten in der Basalzellschicht und eine erhöhte Expression von FGF-BP und dessen mRNA (Kurtz et al., 1997). Während des frühen Stadiums der malignen Progression von humanem Kolonepithel wurde eine erhöhte Expressionsrate von FGF-BP beschrieben, die mit einem signifikanten Anstieg der Blutgefäßdichte positiv korreliert. Allerdings wurde auch in einem kleinen Anteil von Biopsien aus humanem normalem Kolongewebe die Expression von FGF-BP nachgewiesen (Ray et al., 2003).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten existiert auch eine Studie, die FGF-BP eine weitaus weniger bedeutende Rolle bei der Entwicklung des invasiven Plattenepithelkarzinoms zuspricht. So beschreiben Sauter et al. (2001) eine Abnahme der FGF-BP-Expression mit zunehmender Progression normaler Plattenepithelzellen in ein invasives Karzinom. In normalen Keratinozyten wiesen sie eine höhere Rate an FGF-BP verglichen mit Plattenepithelkarzinomzellen nach. Für normale Plattenepithelzellen wurde eine diffuse, moderate bis starke zytoplasmatische

und membranöse Expression von FGF-BP beschrieben, für Karzinomzellen dagegen eine fokale, weniger starke und heterogene Verteilung von FGF-BP.

Zudem konnte keine Förderung des Tumorwachstums und der Vaskularität bei mit FGF-BP transfizierten Plattenepithelkarzinomzellen gegenüber Kontrolltumoren festgestellt werden (Sauter et al., 2001).

1.4.4 Regulation der FGF-BP-Expression durch TPA, EGF, FBS und Retinoide

FBS (fetales Kälberserum) und andere Mitogene wie EGF (Epidermal Growth Factor) und TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) gelten als Induktoren für die Expression von FGF-BP-mRNA, wohingegen Retinoide die Expression sowohl in vitro als auch in vivo vermindern.

Phorbolester wie TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) sind als Aktivatoren der Signaltransduktionskaskade über die Proteinkinase C potente Tumorpromotoren (Blumberg et al., 1988). Einige Studien zeigen, dass die FGF-BP-Expression während der TPA-induzierten Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen gesteigert ist (Kurtz et al., 1997). Die Behandlung von ME-180 Zellen mit TPA führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Expressionssteigerung der FGF-BP-mRNA (Harris et al., 1998). Promotoranalysen ergaben, dass die Promotorelemente Ap-1 und C/EBP für die TPA-Antwort verantwortlich sind. Das Ausmaß der Induktion durch TPA ist allerdings abhängig von Faktoren, die an ein zwischen den beiden genannten Promotorelementen gelegenes E-box-verwandtes Repressorelement binden und darüber die Induktion hemmen können (Harris et al., 1998). Die Effekte von TPA auf die FGF-BP-Gentranskription wird demnach durch ein komplexes Interagieren positiver und einem E-box-verwandtem negativem Regulationselement des Promotors vermittelt.

Die Behandlung von ME-180 Zellen mit FBS resultierte in einem raschen Anstieg der FGF-BP-mRNA als auch der FGF-BP-Gentranskriptionsrate. Obwohl dabei eine ähnliche Kinetik wie bei der Behandlung der Zellen mit EGF auftritt, erfolgt die Induktion zwar nicht über eine EGF-Rezeptoraktivierung, ist aber abhängig von der Aktivierung der PKC, ERK-Kinase und p38-Kinase. Promotoranalysen ergaben, dass das Promotorelement C/EBP in erster Linie für die Serumantwort verantwortlich ist. Anders als bei der Aktivierung von FGF-BP durch EGF wird die transkriptionale

Induktion durch das Serum nicht zusätzlich durch das AP-1- (Aktivatorprotein1) oder E-box-verwandte Promotorelement vermittelt (Harris et al., 2001).

Diese Ergebnisse illustrieren die komplexe Regulation der FGF-BP-Expression durch verschiedene Mechanismen und Promotorelemente, welche im einzelnen von der Art des Stimulus abhängig sind.

Retinoide, eine Gruppe natürlich vorkommender und synthetischer Analoga von Vitamin A, sind potente Regulatoren für das Wachstum und die Differenzierung von Epithelien. Sie inhibieren in verschiedenen epithelialen Geweben die Karzinogenese und zeigen klinische Effekte als Chemotherapeutika bei einigen malignen Erkrankungen, darunter auch Plattenepithelkarzinome (Jetten et al., 1990; Lippman et al., 1995; Lippman et al., 1987). Zudem ist eine Suppression der Karzinogenese für verschiedene Epithelgewebe in Tierversuchen beschrieben (Bertram et al., 1987; Pollard et al., 1991; Shklar et al., 1980).

FGF-BP ist unter anderem ein Ziel für die supprimierende Wirkung von Retinoiden. Die orale Behandlung mit all-trans Retinoidsäure (tRA) über 1 oder 2 Tage induzierte eine signifikante Abnahme von FGF-BP in Magen-, Augen- und Lungengewebe von Ratten (Aigner et al., 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass es in der Plattenepithelzellkarzinom-Zelllinie ME-180 zur zeit- und dosisabhängigen Abnahme der Expression von FGF-BP-mRNA durch die Behandlung mit tRA kommt. Dieser Effekt ist nach einer 24-stündigen Behandlungspause reversibel. Da tRA sowohl die Halbwertszeit der FGF-BP-mRNA von mehr als 16 Stunden auf 5 Stunden als auch die Gentranskription innerhalb einer Stunde reduziert, wurde daraus geschlossen, dass die Abnahme der FGF-BP-mRNA durch Mechanismen auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene vermittelt wird (Liaudet-Coopman und Wellstein, 1996).

Die Behandlung xenotransplanteder Plattenepithelkarzinomzellen in athymischen Nacktmäusen mit tRA führte zu einer Reduktion der FGF-BP-Expression, was mit einer Inhibition der Tumorangiogenese, Induktion von Apoptose und der Abnahme des Tumorwachstums korrelierte (Liaudet-Coopman et al., 1997).

In weiteren Studien wurde die Bedeutung der Retinoidrezeptor-Subtypen RAR und RXR untersucht. Die posttranskriptionale Degradation der FGF-BP-mRNA wurde dabei als vorherrschender Mechanismus für die Reduktion von FGF-BP beschrieben. Die Hauptregulatoren auf diesem Niveau sind die RA-Rezeptoren (Boyle et al., 2000).

Auch andere Regulatoren der FGF-BP-Expression wurden demonstriert. Bei der Karzinogenese von Kolonepithelien konnte eine durch β -Catenin vermittelte erhöhte Expression von FGF-BP nachgewiesen werden (Ray et al., 2003). In einer weiteren Studie wurden Prostatakarzinomzellen mit einem Androgen-Rezeptor transfiziert. Die Stimulation mit Androgenen induzierte einen Anstieg der FGF-BP-mRNA und des Proteins selbst, was für eine Androgen-kontrollierte FGF-BP-Expression spricht (Wong et al., 1995).

1.4.5 Wirkmechanismus von FGF-BP

Die Expression von sekretiertem FGF-BP scheint ein Mechanismus zu sein, durch den extrazellulär gebundenes, immobilisiertes FGF aktiviert und dadurch Tumorstrom und Angiogenese unterstützt wird.

Die nicht-tumorigene, nicht FGF-BP-exprimierende Zelllinie SW13 bildet unter exogener Stimulation durch FGF-2 Kolonien im Soft Agar Assay (Czubayko et al., 1994). Diese Wirkung kann durch endogen exprimiertes FGF-2 allein nicht hervorgerufen werden, allerdings sind mit FGF-BP transfizierte SW13-Zellen in der Lage, ohne Stimulation durch exogenes FGF-2 Kolonien im Soft Agar Assay zu bilden. Diese Wirkung kann durch die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern (Aigner et al., 2001) gegen FGF-2 aufgehoben werden. Die Injektion der mit FGF-BP transfizierten SW13-Zellen in Nacktmäuse führte zur Tumorbildung und Angiogenese. In weiteren Studien wurde durch Ribozym-Targeting die endogene Expression von FGF-BP in Plattenepithelkarzinom- bzw. Kolonkarzinomzellen (ME-180 bzw. LS174T) unterdrückt. Die Reduktion von FGF-BP führte zu einer verminderten Freisetzung von biologisch aktivem FGF-2. Das Wachstum und die Angiogenese xenotransplanteder ME-180- bzw. LS174T-Zellen in Mäusen nahmen ebenfalls parallel zur Ribozym-vermittelten Reduktion von FGF-BP ab (Czubayko et al., 1997).

Diese Daten identifizieren das sekretierte FGF-BP als mögliches Carrierprotein für extrazellulär gebundenes, endogenes FGF-2. Es scheint FGF-2 das Erreichen seines Rezeptors zu ermöglichen und ist damit an den auto- und parakrinen Aktivitäten von FGF-2 in vitro als auch in vivo beteiligt (Czubayko et al., 1994).

Die Bindung von FGF-BP an FGF-2 erfolgt dosisabhängig und spezifisch und wird durch FGF-1, Heparansulfat und Heparinoide inhibiert (Tassi et al., 2001). FGF-BP verändert die Bindungsaffinität von FGF-2 an Heparin ohne zusätzliche Kofaktoren, was den Mechanismus der Freisetzung von FGF-2 aus dem Extrazellulärraum beweist (Aigner et al., 2001). Zudem wurde gezeigt, dass die Zugabe hoher Konzentrationen von gereinigtem FGF-BP aus dem Medium humaner epidermalen Karzinomzellen (A431-AJC) die DNA-Synthese und das Zellwachstum in Mausfibroblastenzellen (3T3) hemmt (Chen et al., 2001). FGF-BP und FGF scheinen Komplexe zu bilden, was über eine Reduktion von freiem FGF-1 und FGF-2 zu einer verminderten Stimulation der DNA-Biosynthese und des Zellwachstums führt. Durch Zugabe von FGF-1 und FGF-2 in sehr niedrigen Konzentrationen zum Medium konnte die durch FGF-BP hervorgerufene Inhibition der DNA-Biosynthese und des Zellwachstums aufgehoben werden; FGF-BP interagiert also mit FGF-1 als auch mit FGF-2 reversibel. Dass FGF-BP FGF-1 und FGF-2 spezifisch bindet, beweist die Tatsache, dass die Zugabe von EGF zu keiner Aufhebung der durch FGF-BP vermittelten Inhibition der DNA-Biosynthese und des Zellwachstums führte. Die Zugabe niedriger Konzentrationen von FGF-BP zum Medium der Mausfibroblastenzellen (3T3) führte im Gegensatz zu den hohen Konzentrationen von FGF-BP zur Induktion der DNA-Synthese und des Zellwachstums. Interessanterweise wurde diese Wirkungsweise von FGF-BP in normalen Zelllinien beobachtet (Mausfibroblastenzellen 3T3, HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells), nicht jedoch in humanen epidermalen Karzinomzellen (A431-AJC) (Chen et al., 2001).

Die biphasische Wirkungsweise von FGF-BP auf die DNA-Synthese spricht zusätzlich zur Funktion als Carrierprotein für eine spezifische, physiologische Rolle des Proteins in der Regulation der Zellproliferation.

In einer weiteren Studie wurde die Wirkungsweise von rekombinant produziertem FGF-BP analysiert. Exprimiert wurde dieses Protein in Insektenzellen (Sf-9-Zellen), die mit einem Baculovirus-Vektor, der für das humane FGF-BP kodiert, infiziert wurden. Dieses rekombinante FGF-BP war in der Lage, exogen appliziertes FGF-2 dosisabhängig und spezifisch zu binden und FGF-2-abhängige Wirkungen auf zellulärer Ebene, wie Zellproliferation von NIH-3T3-Fibroblasten und FGF-2-vermittelte Angiogenese, zu steigern (Tassi et al., 2001). Aigner et al. wiesen für das rekombinant exprimierte FGF-BP ebenfalls eine wachstumsstimulierende Wirkung

nach. Dieser Effekt wurde dabei unabhängig von einer exogenen Applikation von FGF-2 beobachtet. Die Wachstumsstimulation konnte durch die Zugabe von Antikörpern gegen FGF-2 blockiert werden, so dass die parakrinen Effekte von FGF-BP auf dessen Interaktion mit endogen exprimiertem FGF-2 zurückgeführt werden konnten (Aigner et al., 2001).

1.4.6 Rekombinante Expressionssysteme für FGF-BP

Für die Produktion rekombinanter Proteine stehen verschiedene Expressionssysteme zu Verfügung, die sich aus den exprimierenden lebenden Organismen wie z.B. Bakterien, Insektenzellen, Hefen oder Säugerzellen und den entsprechenden Expressionsvektoren zusammensetzen.

Die Proteinproduktion mit Hilfe von Bakterien ist ein verhältnismäßig kostengünstiges Verfahren mit hoher Ausbeute, allerdings sind die Proteine häufig nicht bioaktiv, da in diesem System keine posttranslationalen Modifikationen stattfinden können. Zudem liegen die Expressionsprodukte gelegentlich in Form von schwerlöslichen „inclusion bodies“ vor, was die Gewinnung der Proteine aus der Kultur erschweren kann.

Eine weitere Möglichkeit der Proteinproduktion ist die Verwendung von Insektenzellen, die mit den gewünschten Expressionsvektor enthaltenden Baculoviren infiziert werden. Vorteile gegenüber dem bakteriellen Expressionssystem sind zum einen die meist gute Löslichkeit der Proteine und die Fähigkeit der Zellen zu vielen posttranslationalen Modifikationen und Proteinprozessierungsprozessen höherer eukaryotischer Zellen. Allerdings ist die Kultivierung von Insektenzellen aufwändiger und langwieriger als die von Bakterien. Die Verwendung von Säugerzellen zur Proteinproduktion ermöglicht alle posttranslationalen Modifikationen und Proteinprozessierungsmechanismus höherer eukaryotischer Zellen, allerdings ist die Kultivierung dieser Zellen am zeitaufwändigsten und vergleichsweise kostenintensiv. Hefen sind ebenfalls in der Lage, Proteine zu exprimieren. Auch bei diesem eukaryotischen Expressionssystem finden viele posttranslationale Modifikationen und Proteinprozessierungsprozesse statt, dabei ist ein großer Vorteil gegenüber höheren eukaryotischen Zellen die mit 2-4 h geringere Generationszeit z.B. bei *Pichia pastoris*. Weitere Vorteile des *Pichia*-Expressionssystems sind die extrem hohe Produktionsrate bei intrazellulär lokalisierten Proteinen (bis in den Gramm-Bereich) sowie die

Fähigkeit der effektiven Sezernierung vieler Proteine in ein nahezu proteinfreies Expressionsmedium. Diese Vorteile des Pichia-Expressionssystems wurden bei der Produktion von rekombinantem FGF-BP in dieser Arbeit genutzt.

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse eines Bindeproteins für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF-BP) auf molekularer und funktioneller Ebene. Eine gesteigerte Expression dieses Proteins wird unter anderem bei maligne entartetem Ovarialgewebe beobachtet. Damit ist es als mögliches Ziel für die Therapie von Karzinomen von großem wissenschaftlichem Interesse. Da die Funktionen und der Wirkmechanismus von FGF-BP nur teilweise bekannt sind, widmet sich diese Arbeit der Untersuchung folgender Themen:

- 1.) Untersuchung der Expression von FGF-BP in gesundem und maligne entartetem Ovarialgewebe anhand von Multi-Tissue-Arrays
- 2.) Analyse des Wirkungsmechanismus von FGF-BP:
 - Generierung von FGF-BP-Fusionproteinen des full-length-FGF-BP und dessen N- bzw. C-terminal verkürzten Mutanten
 - Analyse der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine mit Hilfe konfokaler Mikroskopie mit bzw. ohne Koexpression von FGF-2
 - Analyse der biologischen Funktion von full-length FGF-BP bzw. seiner Verkürzungsmutanten im Soft-Agar-Assay mit COS7- und SW13-Zellen
- 3.) Expression und Charakterisierung von rekombinatem FGF-BP
 - Produktion von rekombinantem full-length FGF-BP in *Pichia pastoris*
 - Charakterisierung der Bindungseigenschaften des rekombinanten FGF-BP
 - Analyse der biologischen Funktion des rekombinanten FGF-BP im Soft-Agar-Assay mit COS7-Zellen

2 Materialien und Laborgeräte

2.1 Laborgeräte

Brutschrank (Zellkultur)	Forma Scientific Inc., Ohio, USA
Durchlichtmikroskop	Hund, Wetzlar
EI9001-XCELL II™	NOVEX, Frankfurt/Main
Electrophoresis documentation and Analysis System 120	Kodak, Stuttgart
Feinwaage	Sartorius AG, München
Gelkammer	BioRad Laboratories, München
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer Instruments, Rodgau-Jügesheim
Photometer Helios γ	Unicam Instruments, Cambridge, UK
Hybridisierungssofen	Biometra, Göttingen
Hypercassette™ Expositionskassette	Amersham Biosciences, Freiburg
Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Wetzlar
Mikropipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Mikrowelle R-233 W	Sharp Electronics, Hamburg
Miniprotean II System	BioRad Laboratories, München
pH-Meter GPHR 1400 A	Greisinger Electronic, Regenstauf
Schüttelinkubator	IKA Labortechnik, Staufen
SpeedVac® Plus SC110A	Savant Instruments, Farmingdale, USA
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Bank UV Transilluminator 2000	BioRad Laboratories, München
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge Biofuge	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC 5B	DuPont De Nemours, Bad Nauheim

2.2 Verbrauchsmaterialien

BioMax MS Film	Kodak, Stuttgart
Hyperbond™ -N Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm™ ECL™	Amersham Biosciences, Freiburg
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Papier	Whatman Int., Maidstone, UK
Centricon-Röhrchen YM-10	Millipore, Billerica
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht / Greiner Bio-One
Zellkulturplatten	Cellstar, Briercroft
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien

10 x Taq Polymerasepuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Buffer O+ with BSA	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Buffer Y+ with BSA	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dokumol (SW-Entwickler)	Tetenal, Norderstedt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Heparin Sepharose™	Amersham Biosciences, Freiburg
Humanes FGF-2,-4,-7,-9	NatuTec, Frankfurt
JetPEI	Polyplus, New York, USA
LumiGLO™ Reagent and Peroxid	Cell Signaling Technology, USA
Milchpulver	Sigma, Taufkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen
PedGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnology, Erlangen
Prestained Protein ladder, 10-180 kDa	PEQLAB Biotechnology, Erlangen

RotiPhorese® Gel 40	Roth, Karlsruhe
Salmon sperm DNA	Sigma, Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Yeast extract	Becton Dickinson, Heidelberg

Weitere Chemikalien wurden von den Firmen Merck/Darmstadt, Sigma/Taufkirchen und Roth/Karlsruhe bezogen.

2.4 Materialien für die Kultivierung von Zellen

IMDM-Medium	PAA Laboratories, Linz, Österreich
IMDM-Medium 10 x	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Phosphate buffered saline (PBS), steril	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Viralex™ Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Steriles fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Gewebekulturflaschen 50, 250, 500 ml	Greiner, Frickenhausen
6-, 12-, 96-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen
Einmal-Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Cell-Scraper	Nalge Nunc, Neerijse

2.5 Kits, Enzyme und Marker

DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Qiaprep® Mini-prep Kit	Qiagen, Hilden
LumiGLO HRP Western blot Kit	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
NUCLEOBOND Midi-prep Kit	Macherey-Nagel, Düren
10 mM dNTP Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq Polymerase 500 U	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme: EcoR I, Xho I, Hind III, Xba I, Not I, Avr II, Bgl II	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Prestained Protein ladder (10-180 kDa)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PeqGold DNA Leitemix (0,1-10 kbp)	peqLab Biotechnologie, Erlangen
PeqGold RNase Inhibitor (30 U/ μ l)	peqLab Biotechnologie, Erlangen

2.6 Standardlösungen, Puffer und Medien

Zellkultur		
Einfriermedium	DMSO FCS IMDM	5 % (w/v) 20 % (v/v) ad 100 % (v/v)
10 x PBS	NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH eingestellt auf 7,4 ddH ₂ O	1,5 M 52 mM 17 mM ad 100 % (v/v)
10 x PBST	NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ Tween 20 pH eingestellt auf 7,4 ddH ₂ O	1,5 M 52 mM 17 mM 0,05 % (v/v) ad 100 % (v/v)

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen und Western Blots		
Trenngel 12 %	RotiPhorese® Gel 40 1 M Tris-HCl pH 8,9 10 % SDS ddH ₂ O	30 % (v/v) 37,5 % (v/v) 1 % (v/v) ad 100 % (v/v)
für 2 Gele frisch ansetzen	Trenngel 12 % 10 % (w/v) APS TEMED	12,5 ml 62,5 μ l 6,25 μ l
Sammelgel 4 %	RotiPhorese® Gel 40 1 M Tris-HCl pH 6,8 10 % SDS ddH ₂ O	10 % (v/v) 12,5 % (v/v) 1 % (v/v) ad 100 % (v/v)
für 2 Gele frisch ansetzen	Sammelgel 4 % 10 % (w/v) APS TEMED	4 ml 40 μ l 4 μ l
4 x SDS-Probenauftragspuffer	SDS 2-Mercaptoethanol Glycerol	4 % (v/v) 40 % (v/v) 20 % (v/v)

	Bromphenol blau ddH ₂ O	0,01 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10x SDS-Laufpuffer	Tris-HCl Glycin SDS ddH ₂ O	2,9 % (w/v) 14,4 % (w/v) 1 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10 x Transferpuffer	Tris-HCl Glycin pH 8,9 ddH ₂ O	2,9 % (w/v) 14,4 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10 x TBST	Tris-HCl NaCl Tween 20 ddH ₂ O	1 M 1,5 M 0,05 % (v/v) ad 100 % (v/v)

Filmentwicklung		
Entwicklerlösung	Dokumol	1:6 Verdünnung in H ₂ O
Stopplösung	H ₂ O Essigsäure conc.	2000 ml 20 ml
Fixierlösung	Na ₂ S ₂ O ₅ x H ₂ O K ₂ S ₂ O ₅ H ₂ O	1,26 M 0,11 M ad 100 % (v/v)

Coomassiefärbungen und Gelkonservierungen		
Coomassie-Färbelösung	Coomassie blue Ethanol Essigsäure ddH ₂ O	0,125 % (w/v) 25 % (v/v) 10 % (v/v) ad 100 % (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure Ethanol ddH ₂ O	10 % (v/v) 20 % (v/v) ad 100 % (v/v)
Gelkonservierungslösung	Glycerol Methanol ddH ₂ O	7 % (v/v) 55 % (v/v) ad 100 % (v/v)

Agarosegel-Elektrophoresen		
10 x TAE	Tris-HCl Essigsäure EDTA pH 8 ddH ₂ O	2 M 1 M 0,05 M ad 100 % (v/v)

10 x DNA Ladepuffer	Glycerol EDTA SDS Bromphenol blau Xylencyanol FF ddH ₂ O	50 % (v/v) 0,1 M 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,05 % (w/v) ad 100 % (v/v)
---------------------	--	--

Colony lift		
20 x SSC	NaCl Natriumcitrat ddH ₂ O	3 M 0,3 M ad 100 % (v/v)
50 x Denhardt	Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon BSA ddH ₂ O	1 % (w/v) 1 % (w/v) 1 % (v/v) ad 100 % H ₂ O
Prähybridisierungslösung	5 x SSC 50 x Denhardt 0,5 % SDS ddH ₂ O	2,5 ml 1 ml 500 µl ad 10 ml
kurz vor Gebrauch zugeben	denaturierte (3 min 95°C) Lachs-Sperma-DNA (10 mg/ml)	100 µl
Denaturierungspuffer	NaCl NaOH ddH ₂ O	1,5 M 0,5 M ad 100 % (v/v)
Neutralisierungspuffer	NaCl Tris-HCl pH 7,0 ddH ₂ O	1,5 M 0,5 M ad 100 %

Bakterienkultur		
LB-Medium	Trypton Yeast extract NaCl pH 7,5 ddH ₂ O	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v) ad 100 % (v/v)
LB-Agarplatten mit Ampicillin	Bacto-Agar Ampicillin LB-Medium	1,5 % (w/v) 100 µg/ml ad 100 % (v/v)

Hefenkultur		
10 x B	Biotin ddH ₂ O	0,02 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10 x AA	L-Glutaminsäure L-Methionin L-Lysin L-Leucin L-Isoleucin ddH ₂ O	0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10 x YNB	Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren ddH ₂ O	13,4 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10 x D	Dextrose ddH ₂ O	20 % (w/v) ad 100 % (v/v)
10 x M	Methanol ddH ₂ O	5 % (v/v) ad 100 % (v/v)
10 x GY	Glycerol ddH ₂ O	10 % (v/v) ad 100 % (v/v)
RD	Sorbitol 10 x D 10 x YNB 500 x B 10 x AA ddH ₂ O	186 g 100 ml 100 ml 2 ml 10 ml ad 1000 ml
RDB-Agar	Sorbitol Agarose RD ddH ₂ O	186 g 20 g 300 ml ad 1000 ml
YPD	Hefeextrakt Trypton 10 x D ddH ₂ O	10 g 20 g 100 ml ad 1000 ml
für YPD-Agar	+ Agarose Geneticin	20 g 0-4 mg/ml
BMGY	Hefeextrakt Trypton 1M K ₂ HPO ₄ 10 x YNB 500 x B 10 x GY ddH ₂ O	10 g 20 g 100 ml 100 ml 2 ml 100 ml ad 1000 ml

MM	10 x YNB 500 x B 10 X M ddH ₂ O	100 ml 2 ml 100 ml ad 1000 ml
----	---	--

2.7 Zelllinien

SW13	Humane kleinzellige Nebennierenkarzinom-Zelllinie
COS7	Affen-Fibroblasten-Zelllinie

2.8 Plasmide, Bakterien- und Hefestämme

pRC/CMV Expressionsplasmid	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 3.1 Expressionsplasmid mit CFP	V. Chubarov, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität, Marburg
pcDNA 3.1 Expressionsplasmid mit FGF-2-YFP	A. Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität, Marburg
pPIC6C Expressionsplasmid mit FGF-BP	A. Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität, Marburg
Escherichia coli DH α	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Pichia pastoris GS115	Invitrogen, Karlsruhe
pPIC9K Expressionsplasmid	Invitrogen, Karlsruhe

2.9 PCR-Primer

Die PCR-Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

FGF-BP_1_hin	5'-GGGAATTCATGAAGATCTGTAGCCTCAC-3'
FGF-BP_1_rück	5'-CCGCTCGAGGCATGACGTGTCCTGCAC-3'
BP-N215_1_rück	5'-CCGCTCGAGTCCACAGAACTCCAGGGC-3'
BP-N150_1_rück	5'-CCGCTCGAGTAGCTTAAGACTGGATTCTG-3'
BP-N99_1_rück	5'-CCGCTCGAGATTGCCAGCAAAGACACA-3'
BP-C-91_1_hin	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCCGAATTTTCCTGTGCTTTGC-3'
BP-C-146_1_hin	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCCTCCAGTCTTAAGCTAGTCAG-3'

FGF-BP_2_hin	5`-CCCAAGCTTATGAAGATCTGTAGCCTCAC-3`
FGF-BP_2_rück	5`-GCTCTAGATTAGCATGACGTGTCCTGCAC-3`
BP-N215_2_rück	5`-GCTCTAGTATATCCACAGAACTCCAGGGC-3`
BP-N150_2_rück	5`-GCTCTAGATTATAGCTTAAGACTGGATTCTG-3`
BP-N99_2_rück	5`-GCTCTAGATTAATTGCCAGCAAAGACACAG-3`
BP-C-91_2_hin	5`-CCCAAGCTTATGAAGATCTGTAGCCTCAC-3`
BP-C-146_2_hin	5`-CCCAAGCTTATGAAGATCTGTAGCCTCC-3`
FGF-BP_3_hin	5`-GGGAATTCAAAGTGGTCTCAGAACAAAAG-3`
FGF-BP_3_rück	5`-TTACCTAGGTTAATGATGATGATGATGGTC-3`

2.10 Antikörper

Anti-FGF-BP (monoklonal, Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-BP(T) (polyklonal, Kaninchen)	A. Aigner, Marburg
Anti-myc-tag (monoklonal, Maus)	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti-ERGIC (monoclonal, Maus)	H.-P. Hauri, Basel
Anti-FGF-2 (polyklonal, Kaninchen)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Maus-Ig (Esel), Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Anti-Kaninchen-Ig (Esel) Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Anti-Maus-Ig (Pferd), Texas-red-konjugiert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Kaninchen-Ig (Ziege), Alexa-Fluor-488-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe

3 Methoden

3.1 Methoden in der Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Methoden zur Kultivierung von Zellen

3.1.1.1 Kultivierung

SW13- und COS7-Zellen wurden in sterilen Kulturflaschen mittlerer Größe (75 cm² Fläche) mit 10 ml IMDM und 10% FCS, bzw. 5 % FCS bei Verwendung der Zellen für Soft-Agar-Assays (s.3.1.3), unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Sämtliche Medien und Zusätze wurden bei 4°C gelagert und vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.1.1.2 Passagierung

Erreichten die Zellen eine Konfluenz von > 80%, wurden sie passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS durch Schwenken der Flasche gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin bei 1-2 min Inkubation im Brutschrank (37°C) abgelöst. Durch Zugabe von 8 ml IMDM und 10% FCS wurde das Trypsin verdünnt und inaktiviert. Je nach erforderlicher Zelldichte wurden 0,5-1 ml der Suspension in eine neue Flasche überführt und mit einem entsprechenden Volumen IMDM und 10% FCS auf 10 ml aufgefüllt.

3.1.1.3 Zellzahlbestimmung

Um für verschiedene Experimente die Zellzahl in einer Zellsuspension zu ermitteln, wurde eine Deckglas-bedeckte Zählkammer verwendet, die mit Hilfe einer Pipette befüllt wurde. Die Zellen wurden auf einer Fläche von 4 mm² gezählt, wobei sich an einem Zellgitter orientiert wurde. Der Abstand des Deckglases zum Zellgitter beträgt 0,1 mm, so dass die Zellanzahl in 0,4 µl Volumen ermittelt wird. Um die Zellzahl in 1 ml der ausgewerteten Suspension zu errechnen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10.000/4$$

3.1.1.4 Kryokonservierung

Zur längerfristigen Lagerung von Zellen wurden Kryostocks angefertigt. Hierfür wurde eine Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen gefüllt und bei 1000 x g und 22°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet je nach Volumen in 1-3 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein Einfrierröhrchen pipettiert. In einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß wurden die Zellen langsam auf -80°C abgekühlt. Die Dauerlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Um Zellen aus einem Kryostock wieder zu verwenden, wurden sie rasch bei 37°C aufgetaut und in eine Medium-gefüllte Flasche pipettiert. Nach 4 h Inkubation bei Standardbedingungen wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

3.1.2 Transfektion von DNA

Die Transfektion verschiedener Zelllinien erfolgte unter Verwendung des Transfektiosreagenz JetPEI.

3.1.2.1 Transiente Transfektion

Zunächst wurden COS7- bzw. SW13-Wildtypzellen in 6-Well-Platten mit IMDM und 10% FCS bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% im Brutschrank kultiviert. Pro 6-Well wurden 3 µg des entsprechenden Plasmids in 100 µl 150 mM NaCl pH 7,3 suspendiert. 12 µl des Transfektionsreagenz JetPEI wurden in einem zweiten Ansatz auf 100 µl mit 150 mM NaCl pH 7,3 verdünnt. Die Ansätze wurden 10s gevortext. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die JetPEI-Lösung zur DNA-Lösung pipettiert und gründlich gevortext. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Komplex tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, um zell-toxische Wirkungen von JetPEI zu vermeiden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe der konfokalen Laser-mikroskopie analysiert.

3.1.2.2 Stabile Transfektion

Da alle verwendeten Plasmide ein Resistenzgen für Geneticin (G418) enthalten, können mit Hilfe dieses Antibiotikums die Zellen selektioniert werden, bei denen das

Plasmid stabil integriert wurde. Die Transfektion wurde wie unter 3.1.2.1 beschrieben durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurde dem Medium G418 in einer Konzentration von 1000 µg/ml bei COS7- bzw. 500 µg/ml bei SW13-Zellen zugegeben. Die Behandlung erfolgte über 4 Wochen. Die Klone wurden dann aus den 6-Well-Platten in Flaschen überführt und kultiviert. Lag eine ausreichende Zelldichte vor, wurden Kryostocks angefertigt.

3.1.3 Soft-Agar-Assay

Der Soft-Agar-Assay ist den in-vivo-Bedingungen angenähert, da die Zellen kontaktunabhängig und damit dreidimensional wachsen können.

Die Zellen wurden 3 Tage vor Verwendung in serumreduziertem (5% FCS) IMDM kultiviert, da unter diesen Bedingungen die Unterschiede in der Wachstumskinetik verschieden behandelter Zellen besser beurteilbar waren. Die Konfluenz der Zellen in der Flasche sollte nicht mehr als 50% betragen, um möglichst einzelne Zellen nach Trypsinierung zu erhalten. In einer Sterilbank der Zellkultur wurden folgende Lösungen und Medien in einem Wasserbad auf 42°C erwärmt:

Bezeichnung	Menge [ml]
2,4% (w/v) Agar in ddH ₂ O autoklaviert und in der Mikrowelle geschmolzen	12,5
10x IMDM	1,25
IMDM/5% FCS	37,5

Die Stoffe wurden gemischt und im Wasserbad bei 42°C inkubiert.

In eine 6-Well-Platte wurde pro Well 1 ml des Agargemischs luftblasenfrei gegossen (0,6 % Boden-Agar). Pro Zellkonstrukt wurden 3 Wells gegossen. Während der Bodenagar aushärtete, wurden die Zellen wie unter 3.1.1.2 beschrieben trypsinisiert und gezählt (s. 3.1.1.3) und in IMDM/5% FCS bei RT aufbewahrt. Pro Well wurden 20.000 Zellen eingesetzt, für einen Dreifachansatz wurde eine Zelldichte von etwa 60.000 Zellen/200 µl IMDM/5% FCS eingestellt. Die Zellen sollten möglichst einzeln in der Suspension vorliegen. In einer 12-Well-Platte wurden 200 µl der Zellsuspension mit IMDM/5% FCS auf 1 ml verdünnt und mit 1,5 ml des Agargemisches gemischt. Das Gemisch wurde zügig luftblasenfrei auf 3 Wells verteilt (800µl/Well),

so dass die Endkonzentration des Top-Agars 0,36% betrug. Die 6-Well-Platten wurden 30 min zum Aushärten des Agars in der Flow stehengelassen und anschließend bei Standardbedingungen 3 Wochen inkubiert. Zur Auswertung wurden Kolonien ab einem Durchmesser von 50 µm von zwei unabhängigen Personen gezählt.

Um die Effekte des rekombinanten FGF-BP aus *Pichia pastoris* auf das Wachstum von SW13-Zellen zu untersuchen, wurden die Proteine sterilfiltriert und auf den ausgehärteten Top-Agar appliziert. Dieser Soft Agar Assay wurde in 12-Well-Platten durchgeführt und das Protokoll entsprechend modifiziert: Pro Well wurden 0,7 ml Boden-Agar pipettiert. Für einen Dreifachansatz wurden 40.000 Zellen in 700 µl IMDM/5 % FCS vorgelegt, mit 1 ml Agargemisch vermischt und auf 3 Wells verteilt (600 µl/Well).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Klonierung

3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung verschiedener Konstrukte wurden unterschiedliche Primer (s. 2.9) und DNA-Templates verwendet:

Konstrukt	DNA-Template	Hin-Primer	Rück-Primer
FGF-BP-CFP full length (1-234)	Full length FGF-BP	FGF-BP_1_hin	FGF-BP_1_rück
BP-N-215-CFP (1-215)	Full length FGF-BP	FGF-BP_1_hin	BP-N215_1_rück
BP-N-150-CFP (1-150)	Full length FGF-BP	FGF-BP_1_hin	BP-N150_1_rück
BP-N-99-CFP (1-99)	Full length FGF-BP	FGF-BP_1_hin	BP-N99_1_rück
BP-C-91-CFP (91-234)	Full length FGF-BP	BP-C91_1_hin	FGF-BP_1_rück
BP-C-146-CFP (146-234)	Full length FGF-BP	BP-C146_1_hin	FGF-BP_1_rück
FGF-BP full length (1-234)	Full length FGF-BP	FGF-BP_2_hin	FGF-BP_2_rück
BP-N-215 (1-215)	Full length FGF-BP	FGF-BP_2_hin	BP-N215_2_rück
BP-N-150 (1-150)	Full length FGF-BP	FGF-BP_2_hin	BP-N150_2_rück
BP-N-99 (1-99)	Full length FGF-BP	FGF-BP_2_hin	BP-N99_2_rück
BP-C-91 (91-234)	BP-C-91-CFP	BP-C91_2_hin	FGF-BP_2_rück
BP-C-146 (146-234)	BP-C-146-CFP	BP-C146_2_hin	FGF-BP_2_rück
FGF-BP-myc-his	pPIC6C-FGF-BP	FGF-BP_3_hin	FGF-BP_3_rück

Pro PCR wurden 2 Ansätze auf Eis in folgender Reihenfolge in sterile Eppendorf-Gefäße pipettiert:

Master Mix 1	Master-Mix 2
~ 0,5 µg DNA (Template) 2 µl 10 mM dATP 2 µl 10 mM dTTP 2 µl 10 mM dCTP 2 µl 10 mM dGTP 3 µl 10 pmol/µl Hin-Primer 3 µl 10 pmol/µl Rück-Primer ad 50 µl ddH ₂ O	10 µl 10 x Reaktionspuffer mit 50 mM MgCl ₂ 1 µl Taq-Polymerase ad 50 µl ddH ₂ O

Die beiden Ansätze wurden in ein PCR-Mikroreaktionsgefäß zusammenpipettiert und in einem PCR-Thermocycler inkubiert:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	3	1
94	0,5	35
54	0,5	
72	1,5	
72	6	1
4	unendlich	1

Eine PCR-Produkt-Probe (8 µl) wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel (s. 3.2.1.2) aufgetragen und analysiert. Der restliche PCR-Ansatz wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (s. 3.2.1.3).

3.2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Erfolgskontrolle der PCR sowie zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten genutzt.

Dabei wurden Agarosegele in einer Konzentration von 0,7% verwendet. 0,7 g Agarose wurden in 100 ml 1x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen des Agarosegemisches auf eine Temperatur von etwa 55°C wurden 2 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt und nach gutem Vermengen in eine Gelkammer gegossen. Diese wurde nach Erstarren des Gels in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10% des Endvolumens eines 10x DNA-Probenaufragpuffers versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 90 V durchgeführt. Die DNA-Banden interkalierten dabei das Ethidiumbromid, welches mit UV-Licht sichtbar gemacht wurde und damit zum Nachweis von DNA-Banden diente. Die Gele wurden mit dem Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 digital photographiert.

3.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Um PCR-DNA aus proteinhaltigen Ansätzen zu isolieren, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Die DNA-Lösung wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt und 150 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1) hinzugefügt. Der Ansatz wurde kräftig geschüttelt und nach 5 min Inkubation bei RT 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt und mindestens zweimal mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) gewaschen: 150 µl dieses Gemisches wurden zupipettiert, der Ansatz gut geschüttelt und nach Einstellen zweier Phasen die wässrige in ein neues Gefäß überführt. Zu dieser Lösung wurden 0,1 Volumen einer 5 M NaCl mit einem pH-Wert von 7,2 und 2 Volumen Ethanol p.a. pipettiert. Der Ansatz wurde erneut geschüttelt, 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand sofort abgezogen. Zu dem Sediment wurden 400 µl 70% Ethanol p.a. gegeben, der Ansatz wurde geschüttelt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut sofort abgezogen und das Sediment bei mittlerer Hitze vakuumgetrocknet. Das Sediment wurde je nach Größe in 10-30 µl sterilem ddH₂O resuspendiert und kurz gevortext. Anschließend erfolgten die Restriktion und Ligation der PCR-Produkte und der zugehörigen Plasmide.

3.2.1.4 Restriktion von DNA

Die Restriktion der extrahierten DNA (PCR-Produkte und Plasmide) wurde in einem Endvolumen von 20 µl (in ddH₂O) durchgeführt, welches sich aus der PCR- bzw. Plasmid-DNA, den Endonukleasen (5 U) und dem entsprechenden Puffer zusammensetzte. Die Restriktionsreaktion erfolgte bei 37°C für 2 h im Wasserbad.

Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet:

PCR-Produkt/ Plasmid	Restriktionsenzyme
FGF-BP-CFP	EcoRI, XhoI
BP-N-215-CFP	EcoRI, XhoI
BP-N-150-CFP	EcoRI, XhoI
BP-N-99-CFP	EcoRI, XhoI
BP-C-91-CFP	NotI, XhoI
BP-C-146-CFP	NotI, XhoI
pcDNA3.1-Plasmid mit CFP	EcoRI, XhoI
pcDNA3.1-Plasmid mit CFP und N-terminaler-	NotI, XhoI

Signalsequenz von FGF-BP	
FGF-BP	HindIII, XbaI
BP-N-215	HindIII, XbaI
BP-N-150	HindIII, XbaI
BP-N-99	HindIII, XbaI
BP-C-91	HindIII, XbaI
BP-C-146	HindIII, XbaI
pRC/CMV-Expressionsplasmid	HindIII, XbaI
FGF-2-YFP	HindIII, EcoRI
pcDNA3.1 mit YFP	HindII, EcoRI
FGF-BP-myc-his	EcoRI, AvrII
pPIC9K-Expressionsplasmid	EcoRI, AvrII

Die linearisierte DNA und die im Anschluss dephosphorylierten Plasmide (s.u.) wurden elektrophoretisch im Agarosegel (s. 3.2.1.2) aufgetrennt, um die Vollständigkeit der Restriktion zu überprüfen.

3.2.1.5 Dephosphorylierung restringierter (linearisierter) Plasmid-DNA

Die 5'-endständigen Phosphatgruppen der linearisierten Plasmide wurden mit Hilfe einer Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) entfernt, um einer Religation des Plasmids vorzubeugen. Dazu wurden 2 U der SAP mit 4 µl 10 x SAP-Puffer und 35 µl sterilem ddH₂O vermischt. Der Ansatz wurde zu der Vektorlösung (20 µl) nach der Restriktion zupipettiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Um eine Entfernung innenliegender Phosphatgruppen zu vermeiden, wurde die SAP durch 5 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

3.2.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der restringierten DNA bzw. der linearisierten und dephosphorylierten Plasmide wurden diese aus dem Agarosegel extrahiert.

Die Banden wurden unter UV-Belichtung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen, welches mit Hilfe eines Skalpell am Boden eingeschnitten wurde. Das Gefäß wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt und

bei 13.000 rpm so lange zentrifugiert, bis sich Flüssigkeit im unteren Gefäß gesammelt hatte und die Agarose noch im oberen Gefäße verblieben war (1-5 min).

3.2.1.7 Ligation

Die Ligationsreaktion fand in einem Gesamtvolumen von 10 µl statt. Dieses setzte sich zusammen aus dem linearisierten, dephosphorylierten Plasmid und dem restringierten Insert im molaren Verhältnis 1:5, 1 µl 10x Ligasepuffer, 3 U Ligase und ddH₂O. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

3.2.1.8 Transformation von Escherichia coli

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA von kompetenten Escherichia coli (E.coli) DH5α Bakterien aufgenommen.

Zunächst wurden kompetente E.coli DH5α dem –80°C-Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Die folgenden Schritte wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß durchgeführt: Die ligierte DNA wurde für 3 min bei 65°C inkubiert und danach kurz auf Eis gestellt. Zu je 100 µl kompetenter E.coli DH5α Zellen wurden 2-10 µl des Ligationsansatzes pipettiert und der Gesamtansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42°C wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension 2 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde auf Ampicillin-haltige Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die keine Plasmide aufgenommen hatten und damit keine Ampicillin-Resistenz ausbilden konnten wuchsen nicht auf diesen Agarplatten.

3.2.1.9 Kultivierung und Kryokonservierung transformierter Bakterien

Die E.coli Zellen wurden in flüssigem Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37°C und 240 rpm über Nacht kultiviert. Zur Selektionierung erfolgreich transformierter Bakterien wurde Ampicillin zugegeben (100 µg/ml).

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Kryostocks hergestellt: 1 ml der LB-Bakteriensuspension wurde mit 0,5 ml Glycerin gemischt und bei –80°C aufbewahrt.

3.2.1.10 Colony lift

Beim Colony lift wird eine große Anzahl transformierter Bakterien gleichzeitig auf das Vorhandensein eines Inserts im aufgenommenen Plasmid überprüft. Die Bakterien werden dabei direkt auf einer Membran lysiert und die dann freie DNA durch Exposition bei 80°C fixiert. Anschließend werden komplementäre DNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit einer radioaktiv (^{32}P) markierten DNA-Sonde nachgewiesen.

Agarplatten, auf denen transformierte Bakterien gewachsen waren, wurden vorsichtig mit einer zugeschnittenen Nylon-Membran bedeckt. Mit einem sterilen Glasspatel wurde die Membran leicht angedrückt. Zur Orientierung wurde die Membran sowie die Agarplatte markiert. Die Membran wurde mit einer Pinzette wieder entfernt und mit den angehafteten Kolonien nach oben auf ein mit Denaturierungspuffer getränktes Whatman-Papier in einer Petrischale gelegt und 8 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2x je 8 min auf ein mit Neutralisierungspuffer getränktes Whatman-Papier gelegt. Danach wurde sie kurz mit 2x SSC gewaschen, um alle Zellreste zu entfernen, und danach bei 80°C für 2 h inkubiert, um die DNA auf der Membran zu fixieren (Crosslinking).

Die Membran wurde mit der fixierten DNA nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt und 2 h bei 42°C rotierend im Hybridisierungssofen mit 10 ml der Prähybridisierungslösung inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde eine hitzedenaturierte (95°C, 5 min), radioaktiv markierte DNA-Sonde gegeben. In dieser Lösung wurde die Membran über Nacht bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal bei 42°C mit 15 ml 2x SSC im Hybridisierungssofen rotierend gewaschen und danach in Frischhaltefolie eingepackt. Der Membran wurde ein Kodak BioMax Film in einer BioMax-Kassette aufgelegt und diese bei -80°C inkubiert. Die Expositionszeiten variierten je nach Aktivität der Sonde zwischen 20 min und 2 Tagen. Der Film wurde unter minimalem Rotlicht entwickelt (s.3.3.2.1).

3.2.2 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionskulturen wurde mit Hilfe fertiger Kits durchgeführt.

3.2.2.1 Qiagen Mini-prep Plasmid isolation

Dieses Kit erlaubt eine Isolation geringerer DNA-Mengen, die einer weiteren Analytik bedürfen (Restriktionsanalyse, Sequenzierung), bevor sie für Experimente verwendet werden können.

Einzelne Kolonien transformierter Bakterien wurden von den Agarplatten in 5 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium übertragen und über Nacht bei 37°C im Schüttler herangezogen. Die Kulturen wurden bei 3000x g 10 min zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 250 µl Puffer P1, der RNase A enthält, resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Um die Bakterien alkalisch zu lysieren, wurden 250 µl Puffer P2 zupipettiert und das Gefäß mehrfach vorsichtig invertiert. Das Gemisch wurde bei RT maximal 5 min inkubiert und die Lysereaktion anschließend durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 und mehrfaches Invertieren abgestoppt. Der Ansatz wurde bei 3000x g 15 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde auf eine QIAprep spin Säule gegeben und für 1 min bei 3000x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit 750 µl Puffer PE beladen und erneut bei 3000x g 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wiederum verworfen und die Säule ohne Auftrag für 1 min bei 3000x g zentrifugiert, um überschüssigen Puffer PE zu entfernen. Anschließend wurden 50 µl steriles ddH₂O auf die Mitte der Säulen-Membran pipettiert, 1 min inkubiert und die an der Membran gebundene DNA bei 3000 x g 1 min eluiert.

3.2.2.2 NUCLEOBOND Midi-prep Plasmid isolation

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu reinigen, wurde das NUCLEOBOND Midi-prep System verwendet.

Bakterienkulturen wurden in 250 ml Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Medium bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator herangezogen. Diese Suspensionskultur wurde bei 5000x g 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 4 ml Puffer S1, der RNase enthält, resuspendiert und in ein unbenutztes Gefäß übertragen. 4 ml Puffer S2 wurden zugegeben und 5 min bei RT

inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 4 ml Puffer S3 gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 15.000x g und 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurden AX 100 Säulen mit 2,4 ml Puffer N2 äquilibriert. Der Überstand nach der letzten Zentrifugation wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben, die anschließend zweimal mit je 5 ml Puffer N3 gewaschen wurde. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 5 ml Puffer N5. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 3,6 ml Isopropanol präzipitiert. Das Gemisch wurde mehrfach invertiert und bei 15.000 x g und 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 4 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals bei 15.000x g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und die DNA 10 min luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50-100 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde die Absorption der jeweiligen Probe bei 260 und 280 nm (A_{260 nm} und A_{280 nm}) in einer Quarzglasküvette mit ddH₂O als Nullwert gemessen. Die Konzentration der DNA wurde gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet:

$$K = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{\epsilon \cdot d}$$

K = Konzentration

d = Schichtdicke der Lösung in der Küvette (hier 0,5 cm)

ε = molarer Absorptionskoeffizient (für DNA = 50)

Das Verhältnis der Absorptionen

$$\frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}}}$$

ist ein Maß für die Reinheit der DNA, da für Proteine das Absorptionsmaximum bei 280 nm, für Nukleinsäuren dagegen bei 260 nm liegt. Das Verhältnis der Absorptionen sollte zwischen 1,6 und 1,9 liegen.

3.2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

3.3 Protein- und immunchemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird zur Auftrennung komplexer Proteingemische nach ihrer Größe verwendet. Die Banden werden durch Färbung der Gele oder durch Western-Blotting visualisiert. In dieser Arbeit wurde die Methode zum Nachweis von rekombinant exprimierten FGF-BP (rFGF-BP) verwendet.

Zunächst wurden zwei unterschiedlich hohe Glasplatten und zwei Abstandhalter derselben Stärke mit Isopropanol gereinigt und in die Gießvorrichtung des Miniprotean II Systems dicht eingespannt. Die Ausgangslösungen wurden vor Gebrauch durch Sterilfiltration entgast, um Sauerstoffradikale zu entfernen, die die radikalische Polymerisation bei der Gelbildung beeinträchtigen.

Für zwei Trenngele wurde folgender Ansatz pipettiert:

12% Trenngel:	12,5 ml 12% Trenngellösung
	62,5 µl 10% APS
	6,25 µl TEMED

Der Ansatz wurde durch Invertieren gemischt und anschließend zwischen die Glasplatten gegossen. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Während der Auspolymerisation des Gels wurde das Sammelgel angesetzt:

4% Sammelgel:	5 ml 4% Sammelgellösung
	40 µl 10% APS
	4 µl TEMED

Nach Erstarren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel nach mehrmaligem Invertieren auf das Trenngel gegossen. Der Kamm wurde bis zum Erstarren des Sammelgels eingesetzt. Danach wurden die fertigen Gele in eine Mini Protean II Zelle eingesetzt und mit 1x SDS-Laufpuffer bedeckt. Dieser wurde durch Verdünnen einer 10x SDS-Laufpufferlösung mit ddH₂O hergestellt. Nach Entfernen des Kamms wurden die Taschen mit 1x SDS-Laufpuffer gespült, um Gelreste zu entfernen.

25 µl einer aufzutrennenden Probe wurde mit 8 µl 4x Ladepuffer versetzt, und 5 min bei 100°C inkubiert. Die Proben sowie 5 µl Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)

wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für etwa 45 min.

3.3.1.1 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Färbung wird zum unspezifischen Anfärben von Proteinen verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für 30-60 min mit der Coomassie-Färbelösung auf einem Schütteltisch inkubiert. Das Gel wurde anschließend in Entfärberlösung geschüttelt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben und digital photographiert. Danach wurde das Gel konserviert (s.3.3.1.3).

3.3.1.2 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Silverstain)

Dieses Verfahren ist sensitiver im Nachweis von Proteinen als die Coomassie-Färbung, so dass es bei geringen Proteinmengen angewandt wurde. Die Reaktion beruht auf einer Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber.

Alle Inkubationsschritte (s.Tabelle) erfolgten in Petri-Schalen bei RT unter Schütteln.

Schritt	Inkubationszeit	Lösungen
Fixierung	1 h	50% (v/v) Ethanol 12% Essigsäure
Waschen	3x 20 min	50% (v/v) Ethanol
Quellen	1x 20 min	ddH ₂ O
Vorbehandlung	1x 1 min	10 mg Natriumthiosulfat in 50 ml ddH ₂ O
Waschen	3x 10 s	ddH ₂ O
Imprägnierung	1x 20 min	100 mg Silbernitrat + 25 µl 37% Formaldehydlösung ad 50 ml ddH ₂ O (frisch angesetzt)
Waschen	2x 20 s	ddH ₂ O
Entwicklung	bis zur erwünschten Signalintensität	3 g Natriumcarbonat + 25 ml 37% Formaldehydlösung ad 50 ml ddH ₂ O (frisch agesetzt), bei verzögerter Entwicklung erneut Formaldehydlösung zusetzen
Waschen	2x 20 s	ddH ₂ O

Abstoppen	1x 10 min	50% (v/v) Ethanol 12% (v/v) Essigsäure
-----------	-----------	---

Das gefärbte Gel wurde unmittelbar nach dem Abstoppen digital photographiert und konserviert.

3.3.1.3 Gelkonservierung

Die gefärbten Gele wurden für mindestens 30 min unter Schütteln in der Konservierungslösung inkubiert. Cellophanfolie wurde mit Konservierungslösung getränkt und die Gele luftblasenfrei zwischen zwei Folien eingespannt, über Nacht getrocknet und über mehrere Tage gepresst.

3.3.2 Western-Blot

Nach einer Auftrennung komplexer Proteingemische mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese können mit dem Western-Blot spezifisch Proteine mit Antikörpern identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Western Blot zum Nachweis von rekombinant exprimiertem FGF-BP aus *Pichia pastoris* (rFGF-BP) verwendet.

Zunächst wurden die interessierenden Proben im SDS-Polyacrylamidgel nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.3.1). Auf eine Plattenelektrode einer EI9001-XCELL-IITM Mini-Zelle wurden zunächst 3 mit 1x Transferpuffer befeuchteten Schwämme und ein Whatman-Papier übereinander geschichtet. Das Polyacrylamidgel wurde mit 1x Transferpuffer abgespült und luftblasenfrei auf das Whatman-Papier gelegt. Eine mit 1x Transferpuffer angefeuchtete, auf die Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulosemembran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit einem Whatman-Papier, drei feuchten Schwämmen und zum Schluss mit der zweiten Plattenelektrode bedeckt. Die Elektroden wurden in der Mini-Zelle mit 1x Transferpuffer überschichtet und eine Spannung von 25 V für 50 min angelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde im Anschluß kurz in Ponceau S Lösung inkubiert um den Proteintransfer zu kontrollieren. Durch Spülen mit ddH₂O wurde der unspezifisch gebundene Farbstoff gelöst und die transferierten Proteinbanden sichtbar gemacht. Durch Spülen mit 1x TBST wurde die Membran vollständig entfärbt. Daran schloss sich der immunchemische Nachweis der Proteine an, wobei folgende Antikörper- und Blockierungslösungen verwendet wurden:

Primärantikörper-Ansatz	Blockierlösung	Sekundärantikörper-Ansatz
Anti-FGF-BP 1:250 3% BSA/1x TBST	3% BSA/1x TBST	Esel Anti-Maus-Ig Antikörper, Meerrettich- Peroxidase konjugiert 1:2000 1x TBST
Anti-FGF-BP(T) 1:100 5% Milchpulver/1x TBST	5% Milchpulver/ 1x TBST	Esel Anti-Kaninchen-Ig Antikörper, Meerrettich- Peroxidase konjugiert 1:2500 1x TBST
Anti-myc-tag 1:1000 5% Milchpulver/1x TBST	5% Milchpulver/ 1x TBST	Esel Anti-Maus-Ig Antikörper, Meerrettich- Peroxidase konjugiert 1:2000 1x TBST

Der Nachweis erfolgte gemäß nachstehender Übersicht.

Schritt	Inkubationszeit	Lösung
Abspülen des Transferpuffers	2 min	1x TBST
Blockieren unspezifischer Antikörper- Bindestellen auf der Membran	1 h	Blockierlösung
Waschen	3x 10 min	1x TBST
Primärantikörperbindung	über Nacht bei 4°C	Primärantikörperansatz
Waschen	3x 10 min	1x TBST
Sekundärantikörperbindung	1 h bei RT	Sekundärkörperansatz
Waschen	3x 10 min	1x TBST

Die gewaschene Membran wurde 1 min in frisch angesetzter LumiGLO™-Lösung inkubiert und danach in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde ein Hyperfilm ECL Film in einer Expositionskassette aufgelegt. Die Dauer der Filmexposition betrug 15s - 2 min, abhängig von der Intensität der Signale. Der Film wurde danach entwickelt (s.u.).

3.3.2.1 Filmentwicklung

Exponierte Filme (Western-Blots, Dot-Blots, Colony-lift) wurden im Entwicklerbad inkubiert, bis deutliche Signale erkennbar waren. Dann wurden sie für 2 min in das Stopppbad gelegt und anschließend für mindestens 15 min im Fixierbad inkubiert. Fixierte Filme wurden mit Leitungswasser abgespült und getrocknet.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das DC Protein Assay Kit verwendet. Die Lösung A* wurde angesetzt, indem die Lösung A mit 20% (v/v) der Lösung S versetzt wurde. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden pro Well 22 µl dieses Ansatzes vorgelegt und 5 µl der Proteinprobe bzw. einer Standardreihe (10 mg/ml bis 100 ng/ml BSA in H₂O) dazu pipettiert. 176 µl der Lösung B wurde hinzugefügt und durchmischt. Die Platte wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Mikrotiterplattenphotometer bei 630 nm ausgelesen. Eine Wasserprobe wurde als Nullwert bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus der Absorption der Proben erfolgte mittels linearer Regression der Absorptions- und Konzentrationswerte der Standardreihe.

3.3.4 Liganden-Dot-Blot

Um die Bindungseigenschaften des rekombinant produzierten FGF-BPs aus *Pichia pastoris* zu untersuchen, wurde ein Liganden-Dot-Blot durchgeführt. Als Bindepartner dienten Lösungen von FGF-2, -4, -7 und -9 sowie BSA in einer Konzentration von je 0,1 µg/µl. Je 0,2 µl dieser Lösungen wurde auf eine etwa 5x 35 mm² große Nitrocellulosemembran pipettiert. Das weitere Verfahren ergibt sich aus nachstehender Übersicht.

Schritt	Inkubationszeit	Lösung
Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindestellen auf der Membran	1 h	5% Milchpulver/ 1x TBST
Waschen	3x 10 min	1x TBST
Bindung von FGF-BP	über Nacht bei 4°C	200 µl FGF-BP (Centricon-eingengt) in 1,5 ml 1x TBST

Waschen	3x 10 min	1x TBST
Primärantikörperbindung	über Nacht bei 4°C	Anti-myc-tag 1:1000 5 % Milchpulver/1x TBST
Waschen	3x 10 min	1x TBST
Sekundärantikörperbindung	1 h bei RT	Esel Anti-Maus-Ig Antikörper, Meerrettich- Peroxidase konjugiert 1:2000, 1x TBST

Zum weiteren Vorgehen s.3.3.2.

3.3.5 Immunchistochemische Färbung von Paraffin-fixierten Ovarialgewebeschnitten

Die Paraffin-fixierten Gewebeschnitte wurden von Prof. Dr. G. Sauter (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

Die Färbung der Ovarialgewebeschnitte erfolgte zum Nachweis von FGF-BP gemäß nachstehender Übersicht.

Schritt	Inkubationszeit	Lösung
Deparaffinisierung	2x 10 min	Xylol
Waschen	2x 5 min	100% Ethanol
Rehydratisierung	2 min	90% Ethanol
	2 min	80% Ethanol
	2 min	70% Ethanol
Waschen	5 min	PBST
Epitop-Demaskierung	15 min bei 37°C	9 ml 0,1 M Zitronensäure 41 ml 0,1 M Natriumcitrat in 500 ml ddH ₂ O
Waschen	5 min	PBST
Blockierung endogener Peroxidasen	30 min bei 4°C	2 ml H ₂ O ₂ in 200 ml PBST
Waschen	5 min	PBST

Die Objektträger wurden abgetrocknet und die Schnittfläche mit einem Fettstift begrenzt. Aufgrund der im Folgenden verwendeten verhältnismäßig kleinen Reagenzvolumina wurden die weiteren Schritte in der Feuchtkammer durchgeführt:

Schritt	Inkubationszeit	Lösung
Blockierung unspezifischer Bindungen	1 h bei 37°C	10% Pferdeserum 2% BSA in PBST
Primärantikörperbindung	über Nacht bei 4°C	Anti-FGF-BP 1:100 2% BSA in PBST
Waschen	3x 5 min	PBST
Sekundärantikörperbindung	1 h	Anti-Maus-Ig Antikörper, biotinyliert 1:150 2% BSA in PBST
Waschen	3x 5 min	PBST
Kopplung mit Meerrettich- peroxidase-Komplex	1 h bei 37°C	ABC-Lösung
Waschen	3x 5 min	PBST
Färbung	1-10 min	250 mg DAB in 50 ml ddH ₂ O 180 ml PBST, 20 ml 1 M Tris 25 µl H ₂ O ₂ , pH 7,5
Stoppen der Färbung	5 min	ddH ₂ O
Kontrastfärbung	1-2 min	Hämatoxylin
Waschen	1-5 min	ddH ₂ O

Die gefärbten Tumorschnitte wurden anschließend mikroskopisch begutachtet.

3.3.6 Immunfluoreszenz von ERGIC in COS7-Zellen bzw. FGF-2 in SW13-Zellen

80.000 COS7- bzw. SW13-Zellen wurden auf Deckgläschen in Petrischalen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Transiente Transfektionen wurden nun wie unter 3.1.2.1 beschrieben durchgeführt.

48 h nach der transienten Transfektion wurde das Medium abgesaugt und mit den Zellen folgendermaßen verfahren:

Schritt	Inkubationszeit	Lösung
Waschen	3x 10 s	PBS
Fixierung	10 min	3% Paraformaldehyd/PBS
Waschen	2x 10 s	PBS
Verminderung Paraformaldehyd-vermittelter Autofluoreszenz	30 min	10 mM Ammoniumchlorid
Waschen	3x 10 s	PBS
Permeabilisierung	7 min	0,1% Triton-X100/PBS
Waschen	2x 10 s	PBST
Blockierung unspezifischer Bindestellen	30 min 5 min	1% BSA/PBST 2,5% Pferdeserum/PBST
Waschen	2x 10 s	PBST
Primärantikörperbindung	1 h bei RT	Anti-ERGIC bzw. Anti-FGF-2 1:1000 1% BSA/PBST
Waschen	3x 10 s	PBST
Sekundärantikörperbindung	30 min bei RT	Anti-Maus-Ig (Pferd), Texas-Red-konjugiert bzw. Anti-Kaninchen-Ig (Ziege), Alexa-Fluor-konjugiert 1:100, 2,5% Pferde- bzw. Ziegenserum/ PBST
Waschen	3x 10 s	PBST

Die Zellen wurden anschließend mit dem konfokalen Mikroskop analysiert.

3.4 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Um Zellen mit dem konfokalen Laser-Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss GmbH) zu untersuchen, wurden 80.000 Zellen auf Deckgläschen in Petrischalen ausgesät und 24 h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend transient transfiziert (s.3.1.2.1). 48 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Die Zellen wurden nach ihrer Fixierung (s. 3.3.6) bzw. direkt mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Für die Detektion verschiedener Fluoreszenzen wurde folgende Parameter am Mikroskop eingestellt:

Fluoreszenz	Anregung	Detektion der Emission
Einzel fluoreszenzen		
CFP	Argon Laser, 458 nm	LP-Filter (long pass filter), 475 nm
YFP	Argon Laser, 514 nm	LP-Filter, 530 nm
Alexa Fluor	Argon Laser, 488 nm	LP-Filter, 505 nm
Texas-red	HeNe Laser, 543 nm	LP-Filter, 560 nm

Parallel fluoreszenz von CFP und YFP		
CFP	Argon Laser, 458 nm	BP-Filter (band pass filter), 475-525 nm
YFP	Argon Laser, 514 nm	BP-Filter, 530-600 nm

Parallel fluoreszenz von CFP und Texas- red		
CFP	Argon Laser, 458 nm	BP-Filter, 475-525 nm
Texas-red	HeNe Laser, 543 nm	LP-Filter, 560 nm

3.5 Expression von FGF-BP in *Pichia pastoris*

3.5.1 Das Expressionssystem *Pichia pastoris*/pPIC9k

Ein eukaryotes Expressionssystem ermöglicht eine Produktion von Proteinen, die vollständig prozessiert, gefaltet und posttranslational modifiziert werden. Die Verwendung der Hefe *Pichia pastoris* hat den Vorteil, dass sie einfacher und schneller zu höheren Expressionslevels führen kann verglichen z.B. mit einem Expressionssystem, bei dem mit Baculovirus infizierte Insektenzellen verwendet werden.

Die methylo trope Hefe *Pichia pastoris* ist in der Lage, mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle zu überleben. Methanol wird dabei durch eine Alkoholoxidase mit Hilfe von O_2 zu Formaldehyd umgesetzt, welches als C1-Körper in den Kohlenhydratstoffwechsel eingeschleust wird oder zu CO_2 oxidiert wird. Da das ebenfalls entstehende H_2O_2 für die Zelle toxisch ist, findet der Methanolmetabolismus in den Peroxisomen statt. Die Methanoloxidation wird von zwei Alkoholoxidasen, AOX1 und AOX2, katalysiert. AOX1 zeichnet sich durch eine niedrige O_2 -Affinität aus, die durch eine erhöhte Expression des Enzyms kompensiert wird. Die Anwesenheit von Methanol induziert die Expression der AOX1, da der O_2 -Bedarf für den Methanolabbau steigt; der Anteil der AOX1 kann bis zu 30% aller Zellproteine ausmachen. Aus diesem Grunde wurde der methanolinduzierbare AOX1-Promotor, der die Expression dieses Enzyms reguliert, für heterologe Proteinexpression verwendet.

Für die Expression von FGF-BP in *Pichia pastoris* wurde der Hefen-Stamm GS115 verwendet. In diesem Stamm liegt eine Mutation im Histidinol-Dehydrogenase-Gen vor, was eine Synthese von Histidin verhindert. Zusammen mit den Eigenschaften des verwendeten Vektors pPIC9k dient dies der Selektionierung von sogenannten His⁺ - Mutanten. Der Expressionsvektor pPIC9k enthält eine AOX1-promotorkodierende Sequenz sowie eine Transkriptionsterminationssequenz des AOX1-Gens (AOX1-TT), um eine effektive Expression für das inserierte Gen unter Kontrolle des 5'-AOX1-Promotors zu ermöglichen. Eine Signalsequenz ermöglicht die Sekretion des gewünschten Proteins. Ein weiteres Fragment kodiert für das Histidinol-Dehydrogenase-Gen, das ursprünglich aus dem *Pichia pastoris* Wildtyp isoliert wurde. Zellen des GS115-Stammes, die mit diesem Vektor erfolgreich transformiert wurden,

können Histidin biosynthetisieren (His⁺-Mutanten). Diese Eigenschaft dient als Selektionsmechanismus. Zudem besteht eine Resistenz der transformierten Hefezellen gegen Geneticin. Abhängig von der Anzahl der aufgenommenen Plasmide steigt die Expressionsrate des gewünschten Proteins und die Geneticin-Resistenz (Gendosiseffekt). Diese Resistenz wird genutzt, um aus der Menge der His⁺-Mutanten die Klone zu selektionieren, die die größte Geneticinresistenz und damit höchste Expressionseffizienz haben. Der Selektionsmechanismus in Bakterien beruht auf der Resistenz gegenüber Ampicillin. Eine bakterielle Ursprungssequenz (pBR322) sorgt für die Replikation des Plasmids in *E.coli*. Zudem sind außer der Multiple cloning side (MCS) Enzymschnittstellen für die Plasmidlinearisierung vorhanden, um eine Integration des Plasmids in die genomische DNA der Hefe zu gewährleisten.

Der Expressionsvektor pPIC9k kann in *E.coli* als Plasmid vermehrt werden und wird dann innerhalb der 5'-AOX1-Promotorregion linearisiert, um eine stabile Transformation von *Pichia pastoris* zu ermöglichen. Dabei kommt es zu einem einfachen Überkreuzungsereignis und anschließender homologer Rekombination mit dem 5'-AOX1-Promotor in *P.pastoris*. Da AOX1 bei dieser Integration nicht beschädigt wird, können die Zellen weiterhin Methanol metabolisieren.

Das Expressionsplasmid enthält neben dem für FGF-BP kodierenden Bereich eine C-terminalen Sequenz von 31 Aminosäuren. Darin enthalten ist ein Epitop für einen monoklonalen c-myc-Antikörper und eine Sequenz von sechs aufeinander folgenden Histidin-Molekülen (His-Tag). Dieser His-Tag ist für die spätere Aufreinigung des Fusionsproteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie notwendig.

3.5.2 Herstellung kompetenter *Pichia pastoris* Zellen

5 ml YPD-Medium wurden mit dem *Pichia pastoris*-Stamm GS115 angeimpft und über Nacht bei 29°C und 230 rpm im Schüttler inkubiert bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5.

Die Zellen wurden bei 10.000 rpm und 4°C 5 min zentrifugiert und in 100 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 8 ml eiskaltem 1M Sorbitol aufgenommen, noch einmal zentrifugiert und in 1,5 ml eiskaltem 1M Sorbitol resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden zu je 80

µl in sterile Eppendorfgefäße gefüllt und entweder sofort zur Transformation verwendet oder langsam auf -80°C abgekühlt und aufbewahrt.

3.5.3 DNA-Linearisierung

Für die Linearisierung der Plasmid-DNA (pPIC9k mit bzw. als Kontrolle ohne FGF-BP-kodierende Sequenz) wurden 12 µg DNA mit 10% Endvolumen O+Puffer und 10 U des Restriktionsenzymys Bgl II versetzt. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 100% Endvolumen aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation wurden 10 U Bgl II nachpipettiert. Die DNA wurde anschließend Phenol-Chloroform-extrahiert und in 10 µl sterilem ddH₂O resuspendiert.

3.5.4 Transformation und Selektionierung von *Pichia pastoris* Zellen

50 µl einer auf Raumtemperatur gebrachten Suspension kompetenter Zellen wurde mit 12 µg linearisierter Plasmid-DNA mit bzw. ohne FGF-BP-kodierende Sequenz versetzt und in einer 0,2 cm Elektroporation-Küvette 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 1500 V elektroporiert. Gleich darauf wurde sie mit 1 ml eiskaltem 1M Sorbitol versetzt. Dieses Gemisch wurde gleichmäßig auf 3 RDB-Agar-Platten mit einem Drigalskispatel verteilt und bei 30°C 4-6 Tage bis zur Koloniebildung inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine verdünnte Kryostock-Lösung ausplattiert. Die RDB-Agar-Platten enthielten kein Histidin, so dass nur erfolgreich transformierte Hefen, die zur Histidinbiosynthese (His⁺-Mutanten) fähig waren, wachsen konnten.

1-10 % der gewachsenen Klone enthielten mehr als ein Insert. Mit steigender Anzahl der Inserts in einem Klon nimmt auch dessen Geneticin-Resistenz und Protein-expressionsrate zu (Gendosiseffekt). Dieser Effekt wurde zu Selektionierung von Klonen mit multiplen Inserts genutzt. Diesbezüglich wurden YPD-Agar-Platten mit unterschiedlichen Geneticin-Konzentrationen vorbereitet: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 und 4.0 mg/ml. Auf die gewachsenen His⁺-Klone wurden 1,5 ml steriles ddH₂O pipettiert. Mit Hilfe des Drigalskispatels wurden sie abgelöst, ohne den Agar dabei zu beschädigen. Die Suspension wurde in ein steriles 15 ml-Röhrchen übertragen und mit sterilem ddH₂O auf 5,5 ml aufgefüllt. Nach 5-10 Sekunden Vortexen wurde die Suspension gleichmäßig (etwa 550 µl pro Platte) auf die YPD-

Agar-Platten verteilt und mit dem Drigalskispatel ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C 5-7 Tage bis zur Koloniebildung inkubiert.

3.5.5 Kulturen und Expression

Für die Flüssigkultur wurde ein Klon mit der höchsten G418-Resistenz verwendet, d.h. 4mg/ml bzw. bei den Kontrollklonen ohne FGF-BP-kodierende Plasmidsequenz 2,5 mg/ml. YPD diente dabei als Wachstumsmedium. Die Kulturen wurden bei 29°C und 240 rpm im Schüttler inkubiert. Nach 48 h wurden 5 ml dieser Kultur in 20 ml Geneticin-haltiges (4 bzw. 2,5 mg/ml) YPD-Medium überführt und inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 2-3 erreichte. Die OD₆₀₀ von YPD-Medium diente dabei als Nullwert. Die Zellen wurden bei 4000x g 10 min zentrifugiert und anschließend in Geneticin-haltigem (4mg/ml bzw. 2,5 mg/ml) MM-Medium auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt. Die Kultur wurde 4 Tage in einem sterilen Erlenmeyerkolben bei 29°C und 240 rpm inkubiert und alle 24 h mit Methanol versetzt (0,5 % Volumenprozent).

3.5.6 Kryokonservierung

Einer YPD-Kultur mit einer OD₆₀₀ > 2 wurden 850 µl entnommen und mit 250 µl Glycerin versetzt. Die Kulturen wurden bei -80 °C aufbewahrt und konnten jederzeit wieder auf YPD-Medium angeimpft werden.

3.5.7 Affinitätsreinigung und Anreicherung von FGF-BP aus *Pichia pastoris*

Für die Affinitätsreinigungen wurden am 4. Tag der FGF-BP-Expression 30 ml der MM-Kultur 20 min bei 10.000x g zentrifugiert und mit dem gewonnenen Überstand die jeweiligen Reinigungen durchgeführt.

3.5.7.1 Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose

Bei der Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose bindet der His-Tag (s. 3.5.1) des rekombinant exprimierten FGF-BP spezifisch an das Säulenmaterial mit zweiwertigen Nickelionen. Die Eluation des Fusionsproteins erfolgt mit Imidazol.

Der rFGF-BP-haltige Überstand wurde mit KOH auf pH 8,0 eingestellt. 300 µl Bettvolumen des Ni-NTA-Säulenmaterials wurden mit dem Überstand resuspendiert und 1 h auf Eis geschüttelt. Die Suspension wurde anschließend auf eine Chromatographiesäule gegeben und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 4 ml Puffer W gewaschen. Die Säule wurde verschlossen und das Säulenmaterial für 1 min mit 400 µl Elutionspuffer E inkubiert und anschließend eluiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, so dass 3 Fraktionen zu je 400 µl eluiert wurden. Zur Analyse der Eluate wurde ein Western Blot durchgeführt.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol	50 mM 300 mM 20 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol	50 mM 300 mM 250 mM

3.5.7.2 Affinitätsreinigung über Heparin-Sepharose

Bei der Affinitätsreinigung über Heparin-Sepharose wurde die heparinbindende Eigenschaft von rFGF-BP genutzt, die zu einer Bindung des Proteins an das heparinhaltige Säulenmaterial führte. Die Elution erfolgte mit einer 2 M NaCl-Lösung. Eine Spatelspitze der Heparin-Sepharose wurde zum Vorquellen 5 min in PBS inkubiert. Eine Chromatographiesäule wurde mit der vorgequollenen Heparin-Sepharose bis zum Erreichen eines Bettvolumens von 200 µl gefüllt. Das Säulenmaterial wurde mit 2 ml PBS gewaschen. 8 ml des Überstands der FGF-BP-Expression wurden 1:1 mit PBS verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde das Säulenmaterial zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Die Proteine wurden in 2 Fraktionen mit je 200 µl einer 2 M NaCl eluiert.

Sämtliche Durchflüsse wurden aufbewahrt und später über Centricon-Röhrchen YM-10 um den Faktor 40 durch Zentrifugation bei 5000x g eingeeengt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von FGF-BP in Ovarialkarzinomen

Um den Expressionsstatus von FGF-BP in gesundem bzw. karzinomatös entartetem Ovarialgewebe beurteilen zu können, wurden Multi-Tissue-Arrays mit Hilfe der Immunhistochemie unter Verwendung eines Antikörpers gegen FGF-BP gefärbt und densitometrisch ausgewertet. Es wurden 26 Stanzbiopsien gesunden und 111 Stanzbiopsien malignen Gewebes ausgewertet. Zunächst ergab sich für FGF-BP in beiden Gewebearten eine insbesondere zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 1g-i). Ausgewertet wurde im Anschluß die Intensität der Gewebeanfärbung, wobei 5 Grade unterschieden wurden (0 = keine, 1 = schwache, 2 = moderate, 3 = starke und 4 = stärkste Anfärbung). Bei den Gewebeproben des gesunden Ovarialgewebes konnten lediglich Färbeintensitäten von Grad 0-1 (Abb. 1a-c) verzeichnet werden. Aus diesem Grunde wurden Färbeintensitäten von 0-2 als physiologische Expression und Grad 3 und 4 als Überexpression von FGF-BP interpretiert. Unter Verwendung dieser Klassifikation konnte eine Überexpression von FGF-BP in gesundem Gewebe nicht festgestellt werden, dagegen bei 34 der Schnitte mit malignem Gewebe (Abb. 1d-f), was einer Prozentzahl von 30,6 % (Abb. 2) entspricht.

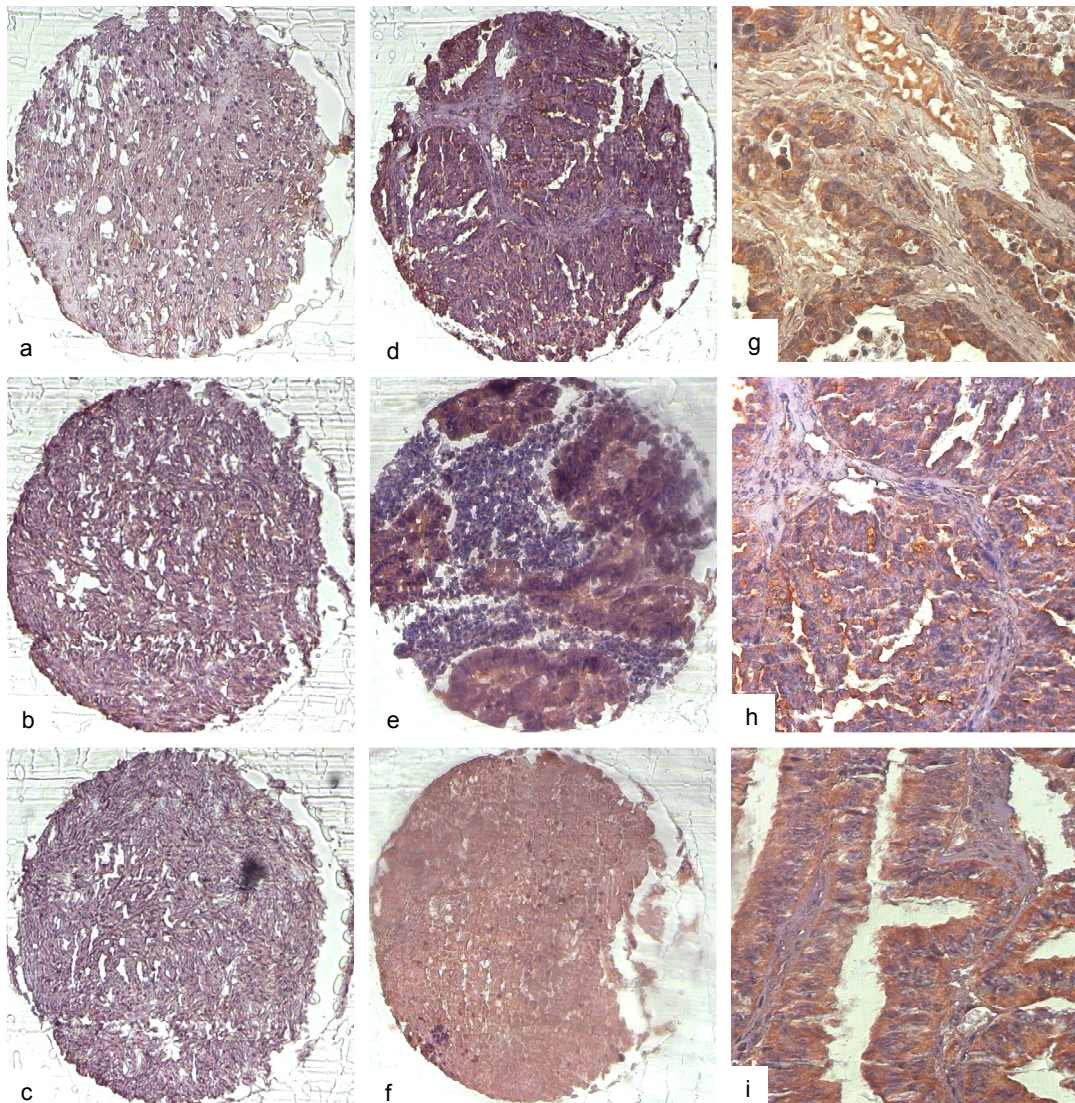


Abb. 1: Repräsentative photographische Darstellung von immunhistochemisch gefärbten Ovarialgewebeschnitten.

FGF-BP färbt sich bei diesem Verfahren bräunlich an. 1a-c repräsentieren die Färbintensität bei gesundem Ovarialgewebe, klassifiziert als Grad 0 oder 1. 1d-i repräsentieren die Färbintensität bei malignem Ovarialgewebe, klassifiziert als Grad 3 oder 4. Die FGF-BP-Expression wurde sowohl bei gesundem als auch bei malignem Ovarialgewebe am intensivsten im Zytoplasma beobachtet.

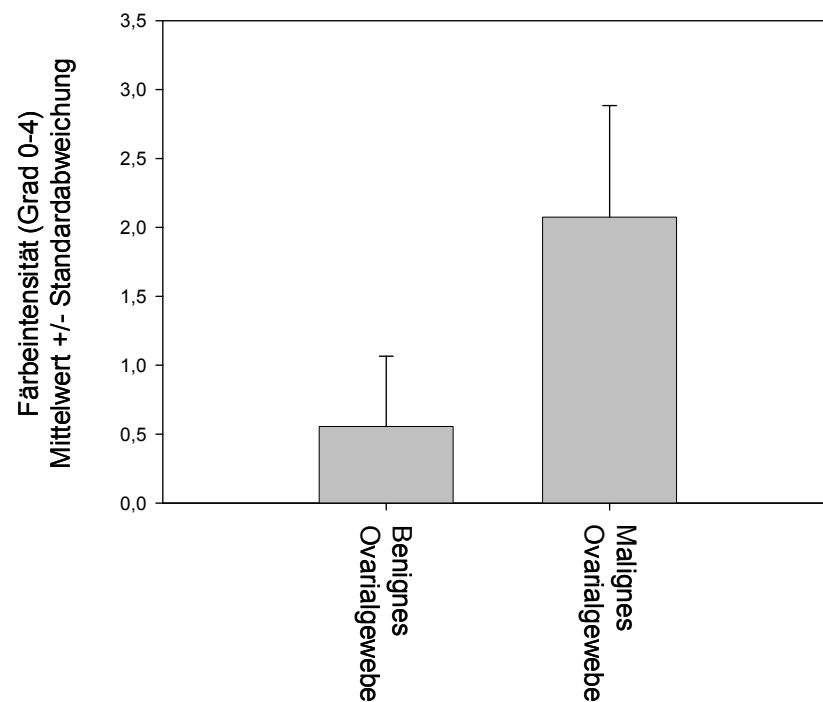


Abb. 2: Graphische Darstellung der mittleren Färbeintensität bei gesundem bzw. malignem Ovarialgewebe.

In karzinomatös entartetem Ovarialgewebe war der Mittelwert der Färbeintensität um das ca. 3fache höher verglichen mit gesundem Ovarialgewebe.

4.2 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und biologischen Funktion verschiedener FGF-BP-Konstrukte in Abhängigkeit von der Expression nukleärer Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

4.2.1 Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP in COS7-Zellen mit bzw. ohne Expression von FGF-2

Um die Funktionen von FGF-BP auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, wurde durch Fusion von CFP (cyan fluorescent protein) mit dem C-Terminus von FGF-BP ein Expressionsvektor, FGF-BP-CFP, konstruiert.

Zur Analyse der subzellulären Verteilung dieses FGF-BP-CFP-Fusionsproteins wurden COS7-Zellen auf Deckplättchen ausgesät und bei Standardbedingungen inkubiert. 24 h nach Aussaat erfolgte die transiente Transfektion mit dem FGF-BP-CFP-Expressionsvektor. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, durch PBS ersetzt und die Zellen mit Hilfe konfokaler Mikroskopie untersucht.

Bei der Fluoreszenzdetektion von CFP ergab sich eine diffuse Verteilung von FGF-BP-CFP im Zytoplasma. Auffallend waren eine verstärkte Fluoreszenz in der Golgi-Region, sowie in Vesikeln nahe derselben (Abb.3), im Zellkern hingegen konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden.



Abb.3: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP in COS7-Zellen.

Es wurde eine auffallende Anreicherung von FGF-BP (blau) in der Golgi-Region (Pfeil) beobachtet. Der Zellkern zeigt keine Fluoreszenz.

Da FGF-2 einer der wichtigsten Bindepartner für FGF-BP darstellt, wurden im folgenden Versuch die Effekte der Interaktion beider Proteine auf die subzelluläre Verteilung von FGF-BP in COS7-Zellen untersucht.

Verwendet wurde dabei die 18 kDa-Isoform von FGF-2, welche C-terminal mit YFP (yellow fluorescent protein) fusioniert wurde.

In einer ersten Versuchsreihe wurden COS7-Zellen mit dem FGF-2-YFP-Expressionsplasmid transient transfiziert und die Fluoreszenz von YFP 48 Stunden nach der Transfektion mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Das FGF-2-YFP war hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, dagegen nur schwach im Zytoplasma. Besonders stark fluoreszierend erschienen die Nukleoli (Abb. 4).

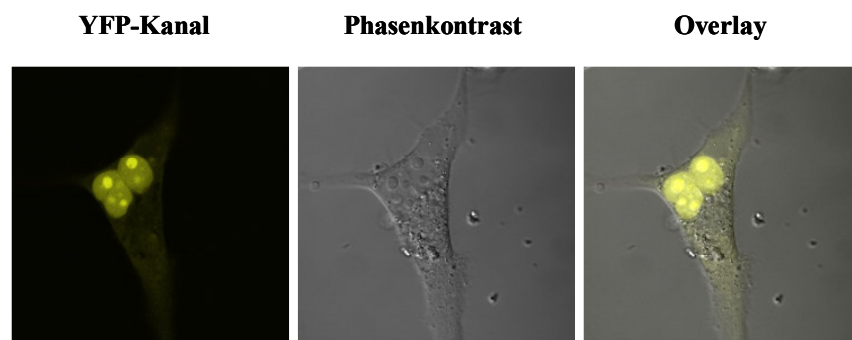


Abb.4: Subzelluläre Lokalisation von FGF-2-YFP in COS7-Zellen.

Es wird eine auffallend starke Anreicherung von FGF-2-YFP (gelb) im Zellkern und den Nukleoli beobachtet. Das Zytoplasma hingegen zeigt eine nur schwache Anreicherung von FGF-2-YFP.

Im Anschluss wurden COS7-Zellen mit FGF-BP-CFP und FGF-2 (ohne YFP) transient kotransfiziert und ebenfalls 48 Stunden nach der Transfektion analysiert. Dabei zeigte sich bei Zellen, die nur mit FGF-BP-CFP transfiziert waren erwartungsgemäß eine starke zytoplasmatische Fluoreszenz (Abb.5a). Hingegen konnte bei Zellen, die beide Proteine koexprimierten neben der starken nukleären auch eine schwache zytoplasmatische Fluoreszenz von FGF-BP-CFP detektiert werden (Abb. 5b). Die Anwesenheit von FGF-2 scheint zu einer Translokation von FGF-BP-CFP vom Zytoplasma in den Zellkern geführt zu haben.

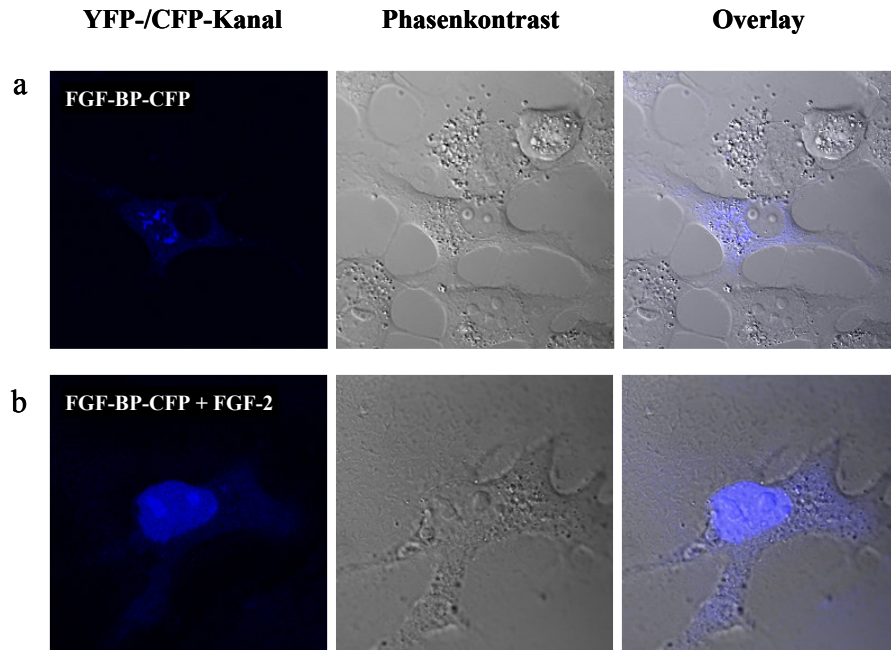


Abb. 5: Koexpression von FGF-BP-CFP und FGF-2 in COS7-Zellen.

a: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP. Es zeigt sich erwartungsgemäß eine Anreicherung von FGF-BP-CFP (blau) im Zytoplasma. b: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP bei Koexpression mit FGF-2. Es findet sich eine starke Anreicherung von FGF-BP-CFP (blau) im Zellkern und den Nukleoli, sowie eine schwächere im Zytoplasma.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden COS7-Zellen mit den beiden Expressionsvektoren FGF-BP-CFP und FGF-2-YFP transient kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Fluoreszenz mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Bei dieser Analyse war die korrekte Konfiguration des Mikroskops von zentraler Bedeutung. Es musste die Separation der beiden Fluoreszenzspektren von CFP und YFP bei der parallelen Aufnahme beider Proteine gewährleistet sein, um eine Fehlinterpretation bezüglich der Kolo-kalisation der Proteine auszuschließen. Diese Einstellungen wurden an Zellen vorgenommen, die entweder mit FGF-BP-CFP oder mit FGF-2-YFP transfiziert waren und wurden für die parallele Detektion der Fluoreszenzen für die folgenden Bilder beibehalten.

Dabei ergab sich wie erwartet eine zytoplasmatische und Golgi-nahe Lokalisation von FGF-BP in den Zellen, die nur mit dem FGF-BP-CFP-Expressionsvektor transfiziert waren (Abb. 6a), und eine nukleäre Fluoreszenz bei den ausschließlich FGF-2-YFP-exprimierenden Zellen (Abb. 6b). Bei Zellen dagegen, die FGF-BP-CFP und FGF-2-YFP koexprimierten, zeigte sich eine gemeinsame nukleäre Lokalisation beider Proteine (Abb. 6c). Die bereits beschriebene These einer Translokation von

FGF-BP durch die Anwesenheit von FGF-2 wurde durch diese Untersuchung bestätigt.

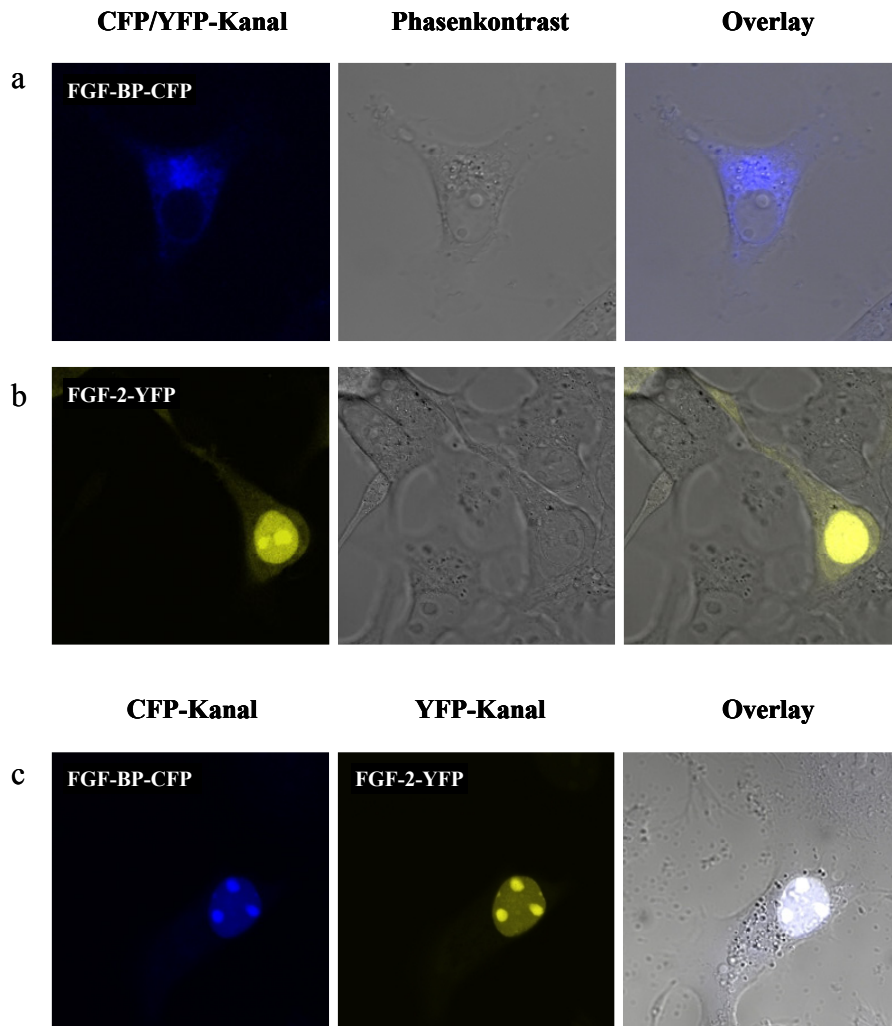


Abb. 6: Koexpression von FGF-BP-CFP und FGF2-YFP in COS7-Zellen.

a: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP. Es zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma (blau). b: Subzelluläre Lokalisation von FGF2-YFP. Hier findet sich eine starke Anreicherung im Zellkern und den Nukleoli (gelb). c: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP (blau) bei Koexpression mit FGF2-YFP (gelb). Es zeigt sich eine starke Fluoreszenz beider Proteine im Zellkern.

4.2.2 Kolokalisation von FGF-BP und ERGIC in COS7- Zellen

Die auffallend starke Fluoreszenz im Bereich der Golgi-Region und dort befindlicher Vesikel bei FGF-BP-CFP-exprimierenden Zellen gaben Anlass zu weiterführenden Analysen.

FGF-BP enthält ein Signalpeptid am N-Terminus, welches für seine Sekretion verantwortlich ist. Die Proteinbiosynthese findet am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) statt. Die entstandenen Proteine werden anschließend gefaltet und gelangen in aus dem rER stammenden Transport-Vesikeln zum Golgi-Apparat, wo die weitere Modifikation der Proteine erfolgt. Dieser Transport erfolgt durch ein Zwischenkompartiment, welches als Endoplasmatic Reticulum Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) bezeichnet wird (Arar et al., 1995). Schließlich werden die Proteine in sekretorische Vesikel verpackt und gelangen an die Plasmamembran, wo die Exozytose stattfindet.

Die beobachteten Fluoreszenzen von FGF-BP-CFP in der Golgi-Region (z.B. Abb. 3, Pfeil) deuten auf die Präsenz des Proteins im ERGIC hin. Um dies nachzuweisen, wurde die Kolokalisation von FGF-BP-CFP und einem ERGIC-spezifischen Protein (ERGIC-53) in COS7- Zellen analysiert.

COS7-Zellen wurden mit dem FGF-BP-CFP-Expressionsvektor transient transfiziert und 48 Stunden danach fixiert. Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern aus Mäusen gegen ERGIC und Texas-red-konjugierten Zweitantikörpern wurde das ERGIC-Marker-Protein ERGIC-53 durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Bei diesen Zellen wurde eine Kolokalisation beider Proteine in derselben Zelle beobachtet (Abb. 7).

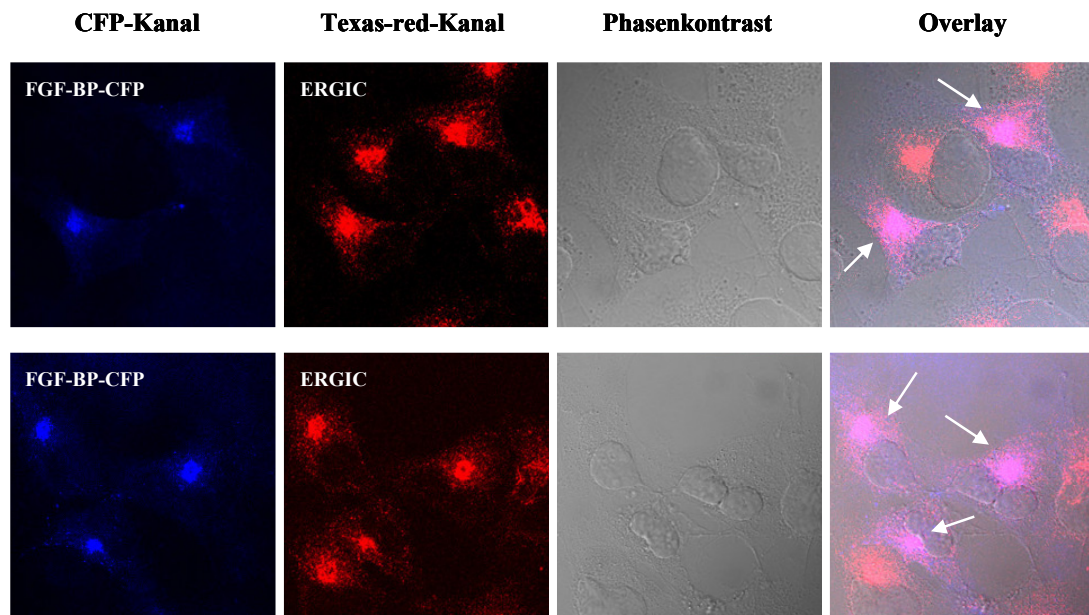


Abb. 7: Kolokalisation von FGF-BP-CFP und ERGIC-53 in COS7-Zellen.

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz wurde das ERGIC unter Verwendung monoklonaler ERGIC-Antikörper und Texas-red-konjugierten Zweitantikörpern in COS7-Zellen detektiert. Bei der Auswertung der Fluoreszenzen mit Hilfe des konfokalen Mikroskops fand sich eine Kolokalisation (Pfeile) von FGF-BP-CFP (blau) und dem ERGIC-Markerprotein ERGIC-53 (rot).

4.2.3 Einfluss von N- bzw. C-terminalen Verkürzungen auf die intrazelluläre Verteilung von FGF-BP

Aus der in den vorangegangenen Experimenten beobachteten intrazellulären Interaktion von FGF-BP und FGF-2 in COS7-Zellen ergab sich die Fragestellung, welches Segment von FGF-BP für die Interaktion mit FGF-2 verantwortlich ist.

Diesbezüglich wurden C- bzw. N-terminal verkürzte Mutanten von FGF-BP mit CFP fusioniert. Dabei wurden unter anderem bestimmte Disulfidbrücken innerhalb des Proteins gezielt zerstört. Damit die Sekretion des Proteins gewährleistet war, wurde die dafür verantwortliche Signalsequenz an alle N-terminal verkürzten Konstrukte angehängt (Abb. 8).

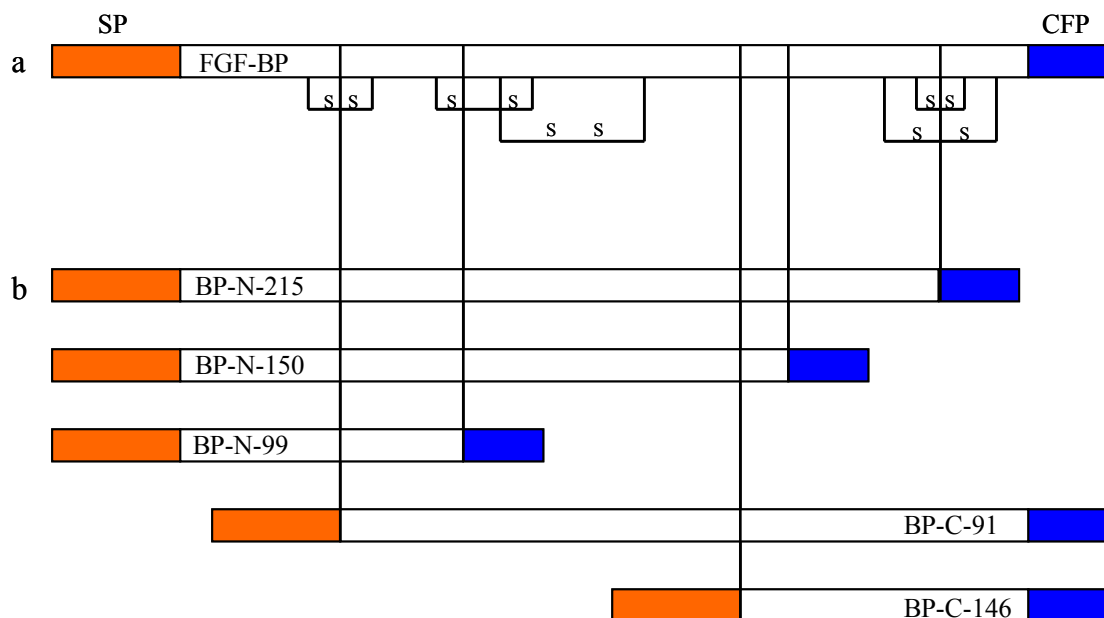


Abb. 8 : Schema von FGF-BP und dessen Verkürzungsmutanten.

a: full length FGF-BP mit Signalpeptid (SP, orange), Disulfidbrücken (S-S) und CFP (blau). b: C-terminal verkürzte Formen bestehend aus den Aminosäuren 1-215 (BP-N-215), 1-150 (BP-N-150), bzw. 1-99 (BP-N-99). N-terminal verkürzte Formen bestehend aus den Aminosäuren 91-234 (BP-C-91) bzw. 146-234 (BP-C-146) mit angehängtem Signalpeptid.

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Konstrukte in COS7-Zellen ermittelt. Dazu wurden COS7-Zellen nach 24ständiger Inkubation bei Standardbedingungen mit den jeweiligen Konstrukten transient transfiziert und 48 Stunden danach durch konfokale Mikroskopie ausgewertet.

Ähnlich wie beim full-length FGF-BP beobachtet (Abb. 9a links), fand sich bei allen der mit CFP fusionierten Verkürzungsmutanten eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation. Auch hier zeigten sich stark fluoreszierende Anteile in der Golgi-Region (Abb. 9b-d links).

Im Folgenden wurden COS7-Zellen mit dem FGF-2-YFP-Expressionsvektor und jeweils einer der FGF-BP-CFP-Verkürzungskonstrukte transient kotransfiziert und 48 Stunden danach ausgewertet.

Unter Koexpression mit FGF-2-YFP ergab sich für alle C-terminal verkürzten FGF-BP-Konstrukte, wie bereits für full-length FGF-BP beobachtet, eine Kolokalisation der jeweiligen Proteine im Zellkern (Abb. 9a-d rechts). Im Gegensatz hierzu konnte keine Kolokalisation im Nukleus für die N-terminal verkürzten FGF-BP-Konstrukte bei Koexpression mit FGF-2-YFP gefunden werden (Abb. 9e-f rechts). Die Verteilung der Fluoreszenzen von CFP entsprach hier der Verteilung ohne die Koexpression von FGF-2. Eine Translokation von FGF-BP in den Zellkern unter Koexpression von FGF-2 fand bei N-terminal verkürzten Mutanten nicht statt.

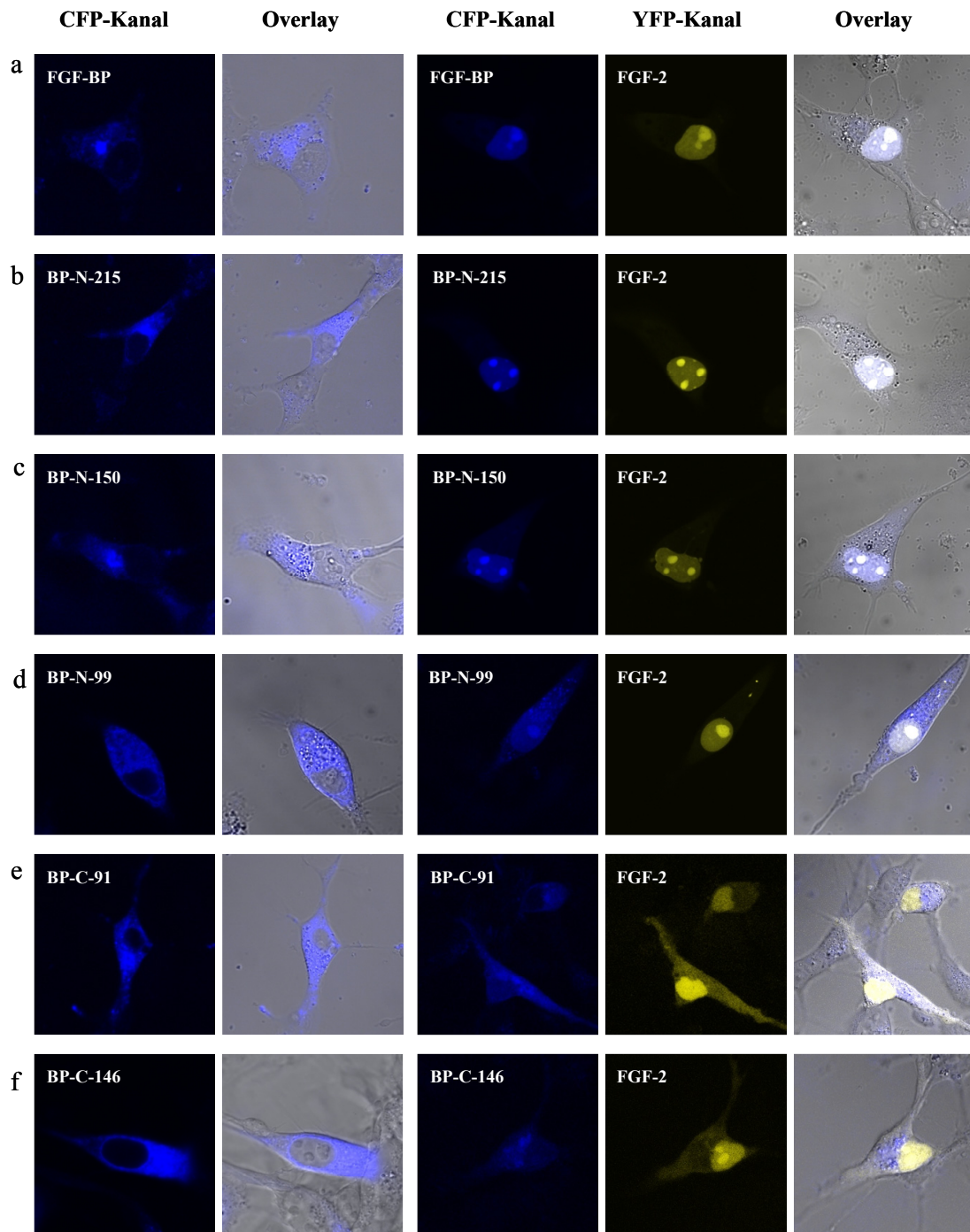


Abb. 9: Koexpression und Interaktion verschiedener FGF-BP-Verkürzungsmutanten und FGF2-YFP.

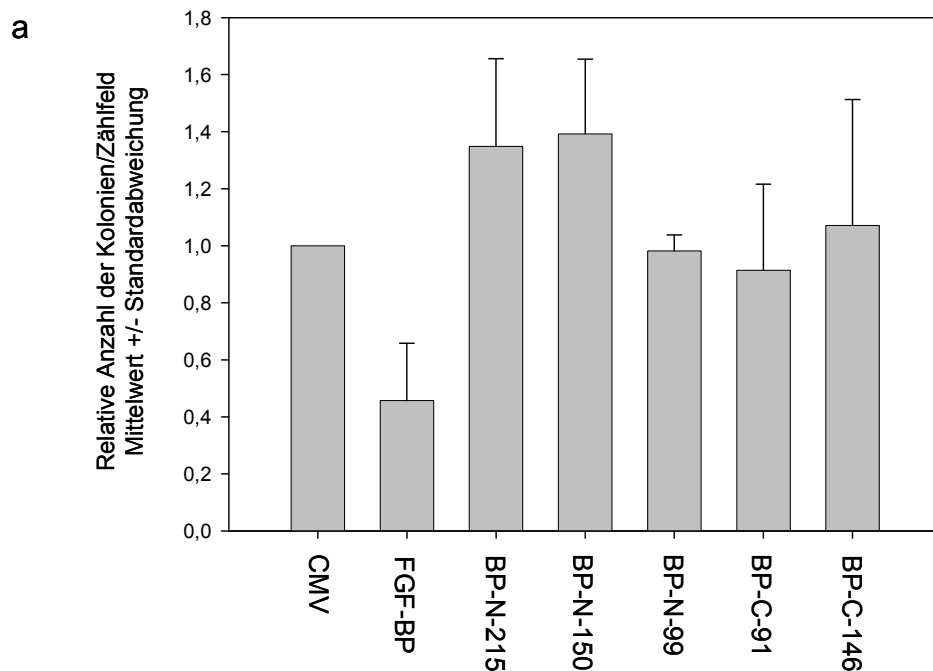
b-f: Subzelluläre Lokalisation der Verkürzungsmutanten von FGF-BP-CFP (blau). Bei allen Mutanten findet sich wie bei full length FGF-BP (a) eine starke zytoplasmatische Fluoreszenz von FGF-BP-CFP (blau). Bei Koexpression der FGF-BP-Mutanten (blau) mit FGF-2-YFP (gelb) zeigt sich bei den C-terminal verkürzten Mutanten (b-d) eine Kolokalisation der Proteine im Zellkern. Diese Translokation von FGF-BP in den Zellkern bei Koexpression mit FGF-2 wird bei den N-terminal verkürzten Mutanten (e, f) nicht beobachtet.

4.2.4 Biologische Aktivität von FGF-BP und FGF-BP-Verkürzungs- mutanten in COS7- Zellen

Um die biologische Aktivität von FGF-BP und dessen Verkürzungsmutanten zu untersuchen, wurde ein Soft-Agar-Assay durchgeführt, bei dem in-vivo-ähnliche Wachstumsbedingungen wie kontaktunabhängiges, dreidimensionales Wachstum einzelner Zellen (Kolonienbildung) gegeben sind.

Zunächst wurden FGF-BP und dessen C- bzw. N-terminal verkürzte Formen ohne Fusionspartner in das Expressionsplasmid pRC/CMV kloniert. COS7-Zellen wurden mit diesen Konstrukten bzw. dem leeren Plasmid pRC/CMV als Kontrolle stabil transfiziert und ein Soft-Agar-Assay durchgeführt. Nach drei Wochen Wachstum unter Standardbedingungen wurden Kolonien mit einer Mindestgröße von 50 µm ausgezählt.

Bei der Auswertung fand sich ein inhibitorischer Effekt von full length FGF-BP auf das Wachstum der COS7-Zellen im Soft-Agar-Assay, was in einer Abnahme der Koloniebildung im Vergleich zu den Kontrollzellen resultierte. Dagegen bildeten sich bei den mit den Verkürzungsmutanten transfizierten Zellen große Kolonien im Soft-Agar-Assay (Abb.10). Der inhibitorische Effekt von FGF-BP auf das Zellwachstum bei COS7-Zellen wurde nach Verlust des C- bzw. N-Terminus nicht mehr beobachtet.



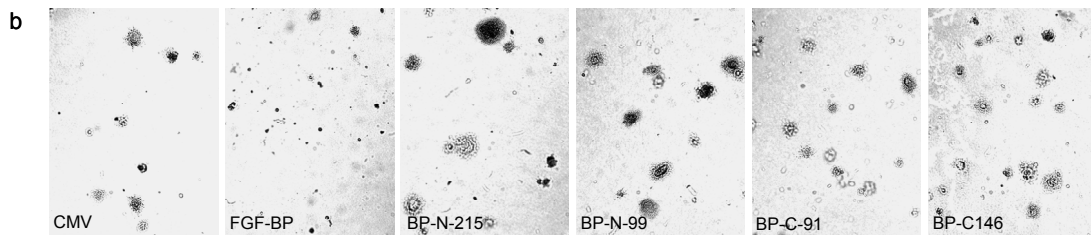


Abb. 10: Soft-Agar-Assay mit full length FGF-BP bzw. dessen Verkürzungs-mutanten stabil transfizierten COS7-Zellen.

a: Graphische Auswertung des Soft-Agar-Assays bezogen auf die Kolonienzahl der Kontrollzellen (= 1.0). Mit full length FGF-BP transfizierte COS7 Zellen bildeten kleine Kolonien verglichen mit den Kontrollzellen, die mit einem Leervektor (CMV) transfiziert wurden. Dieser inhibitorische Effekt von full length FGF-BP auf das Wachstum von COS7-Zellen im Soft-Agar-Assay wurde mit Verlust des C- bzw. N-Terminus von FGF-BP nicht beobachtet. 10b: Repräsentative photographische Darstellung der ausgewerteten Soft-Agar-Assay-Kolonien.

4.2.5 Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP in endogen FGF-2-exprimierenden SW13- Zellen

SW13 ist eine nicht-tumorigene Nebennierenkarzinom-Zelllinie, die FGF-2, aber kein FGF-BP exprimiert. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden SW13-Zellen verwendet, um die subzelluläre Lokalisation von FGF-BP sowie die Effekte der Interaktion von FGF-BP und FGF-2 auf das Zellwachstum zu untersuchen.

Hierzu wurden SW13-Zellen auf Deckplättchen ausgesät und nach 24stündiger Inkubation bei Standardbedingungen mit dem FGF-BP-CFP-Expressionsvektor transient transfiziert.

Bei der konfokalen Mikroskopie ergab sich eine nukleäre Lokalisation von FGF-BP-CFP im Gegensatz zur zytoplasmatischen Verteilung in COS7-Zellen. Ebenso wurden keine Fluoreszenzen im ERGIC detektiert (Abb. 11a).

Um festzustellen, ob die subzelluläre Lokalisation des endogenen FGF-2 in SW13-Zellen der Verteilung von FGF-BP entsprach, wurde durch Immunfluoreszenz das endogene FGF-2 nachgewiesen. Hierbei wurden auf Deckplättchen gewachsene SW13-Zellen nach 24 Stunden fixiert. Durch Verwendung eines polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen gegen FGF-2 und Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörpers gegen Kaninchenantigene wurde das endogene FGF-2 detektiert. Die Untersuchung ergab eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation von FGF-2 und ein nur schwaches Signal im Zytoplasma (Abb. 11b). Beide Proteine (endogenes FGF-2 und FGF-BP) waren im Kern der SW13-Zellen kolokalisiert.

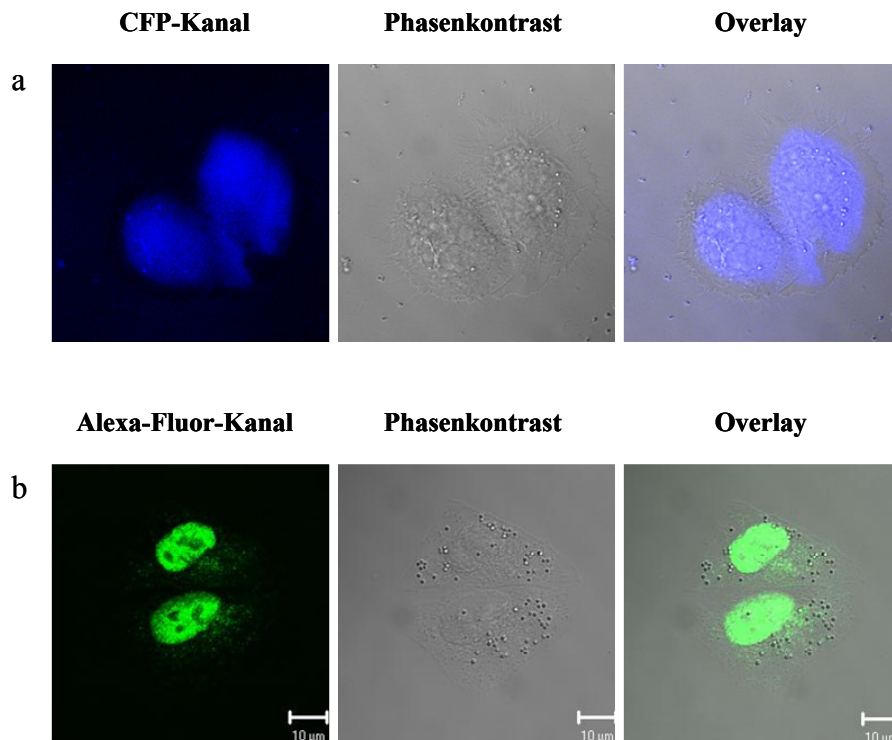


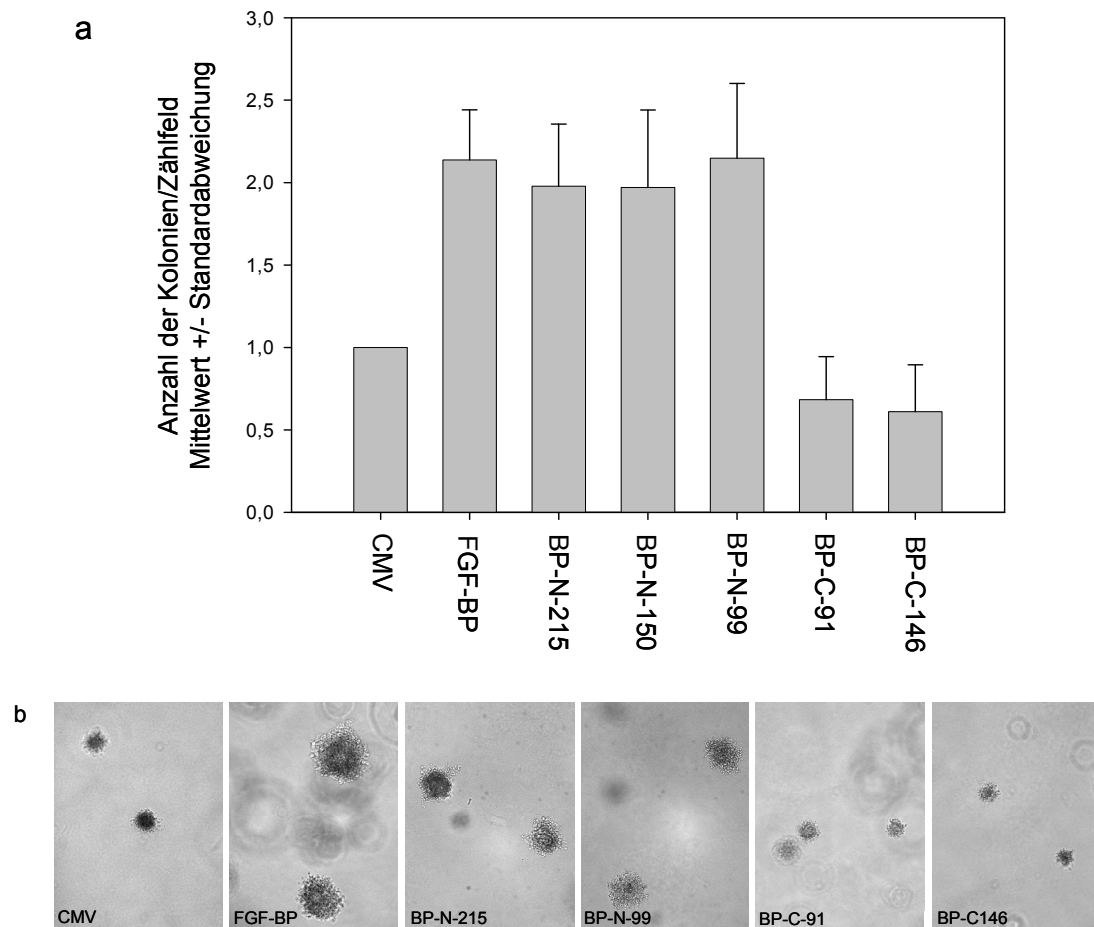
Abb. 11: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP und endogenem FGF-2 in SW13-Zellen.

a: Subzelluläre Lokalisation von FGF-BP-CFP (blau) (konfokale Lasermikroskopie). Es zeigt sich eine starke Fluoreszenz im Nukelolus. b: Subzelluläre Lokalisation von endogenem FGF-2 (Immunfluoreszenz). Auch hier fand sich eine hauptsächlich nukleäre Anfärbung von FGF-2 (grün).

4.2.6 Biologische Aktivität von FGF-BP und FGF-BP-Verkürzungs- mutanten in SW13- Zellen

Um die biologische Aktivität von FGF-BP und dessen Verkürzungsmutanten in den endogen FGF-2-exprimierenden SW13-Zellen zu untersuchen, wurden ebenfalls Soft-Agar-Assays durchgeführt. Wie unter 4.2.4 für COS7-Zellen bereits geschildert wurde mit den SW13-Zellen auf gleiche Weise verfahren und nach 3wöchiger Inkubation Kolonien ab einer Größe von 50 μm ausgezählt.

Bei den mit FGF-BP transfizierten Zellen wurde eine signifikant höhere Anzahl größerer Kolonien beobachtet, verglichen mit den mit dem Leervektor pRC/CMV transfizierten Kontrollzellen. Dieser Effekt konnte auch für die mit den C-terminal verkürzten FGF-BP-Mutanten transfizierten Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte eine solche Wachstumsinduktion bei den mit den N-terminal verkürzten FGF-BP-Konstrukten transfizierten Zellen nicht beobachtet werden (Abb.12).



**Abb. 12: Soft-Agar-Assay mit full length FGF-BP bzw. dessen Verkürzungs-
mutanten stabil transfizierten SW13-Zellen.**

a: Graphische Auswertung des Soft-Agar-Assays bezogen auf die Kolonienzahl der Kontrollzellen (= 1.0.) Mit full length FGF-BP bzw. C-terminal verkürzten FGF-BP-Mutanten transfizierte SW13-Zellen bildeten größere Kolonien verglichen mit den Kontrollzellen, die mit einem Leervektor (CMV) transfiziert wurden. Diese Induktion der Koloniebildung konnte bei den mit N-terminal verkürzten FGF-BP-Mutanten transfizierten Zellen nicht beobachtet werden.. b: Repräsentative photographische Darstellung der ausgewerteten Soft-Agar-Assay-Kolonien.

4.3 Herstellung von rekombinantem FGF-BP (rFGF-BP) in *Pichia pastoris*

4.3.1 Etablierung der Expression

Zur Herstellung von rekombinantem FGF-BP (rFGF-BP) wurde die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* und das Expressionsplasmid pPIC9k verwendet, welches u.a. ein Resistenzgen gegen Geneticin trägt (s. 3.5.). Eine Selektionierung der erfolgreich transformierten Hefezellen gelang über die Anzucht auf einem Nährmedium, welches kein Histidin enthielt. Nur Hefezellen die das Expressionsplasmid aufgenommen hatten, waren in der Lage, auf diesem Nährboden zu wachsen. Etwa 1-10% der transformierten Hefezellen enthalten nach der Transformation mehr als ein Insert, womit auch die Geneticin-Resistenz zunimmt (Gendosiseffekt). Dementsprechend wurde bei der Selektionierung der transformierten *Pichia-pastoris*-Zellen auf Geneticin-haltigen YPD-Agar-Platten eine Abnahme der Anzahl der Klone mit zunehmender Geneticin-Konzentration (G418) beobachtet. So fanden sich bei den FGF-BP-exprimierenden Hefezellen bei einer Geneticin-Konzentration von 1 mg/ml 15 Klone, bei 4 mg/ml noch 2. Die mit dem Leervektor transformierten Zellen bildeten bei einer Geneticin-Konzentration von 1 mg/ml 11 Klone, bei 2,5 mg/ml noch 1 Klon. Da eine Selektionierung bezüglich der erfolgreich transformierten Hefezellen bereits stattgefunden hatte (s.o.) und über die Geneticin-Resistenz lediglich die Klone mit der größten Expressionsrate bestimmt wurden, konnte für die Proteinexpression bzw. Kontrollexpression ein Klon mit der unabhängig voneinander höchsten Geneticin-Resistenz verwendet werden (4 bzw. 2,5 mg/ml).

BMGY-Medium (Herstellerempfehlung) wurde mit den jeweiligen Klonen beimpft und bei 29°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Allerdings zeigte sich trotz mehrtägiger Inkubation kein Wachstum, so dass ein anderes Wachstumsmedium, YPD, beimpft wurde. Hier konnte ein deutliches Wachstum verzeichnet werden. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Zellen in ein Expressionsmedium (MM) überführt und täglich mit Methanol zur Stimulation der Proteinexpression versetzt. Es wurden über den Expressionszeitraum von 4 Tagen täglich Proben entnommen, die im Western Blot ausgewertet wurden. Es zeigte sich bei den mit dem FGF-BP-Expressionsplasmid transformierten Zellen eine etwa 37 kDa große Bande, deren Intensität im Westernblot vom 1. bis zum 4. Expressionstag zunahm, am 5. Expressionstag jedoch nicht mehr nachweisbar war (Abb.13).

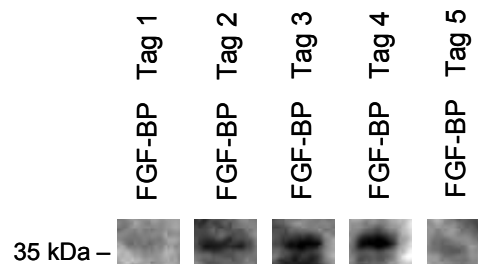


Abb. 13: Western Blot mit täglichen Proben aus dem Expressionsmedium (MM).
 Es zeigt sich bei den Proben der ersten 4 Tage (FGF-BP Tag 1-4) eine Zunahme der Bandenstärke bei 37 kDa. Am 5. Expressionstag sind die beiden Banden kaum nachweisbar. Primärantikörper: Anti-myc-tag 1:1000 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-mouse 1:2000 in TBST.

Die Expression mit Zunahme der Bandenintensität innerhalb der ersten 4 Expressionstage und Abnahme am 5. Expressionstag konnte nicht reproduziert werden, so dass einige Expressionsparameter optimiert werden mussten.

Um eine Kontamination mit nicht-FGF-BP-exprimierenden Zellen auszuschließen, wurden verschiedene Expressionsansätze mit Zusatz von Geneticin in unterschiedlichen Konzentrationen erstellt, wobei weiterhin mit dem FGF-BP-exprimierenden Klon der höchsten Geneticin-Resistenz (4 mg/ml) gearbeitet wurde. Zunächst wurde eine YPD-Vorkultur mit Geneticin (4 mg/ml) beimpft. Selbst nach mehrtägiger Inkubation konnte kein Wachstum verzeichnet werden.

Im folgenden Ansatz wurden die Hefezellen in vorerst Geneticin-freiem YPD-Medium 2 Tage herangezogen. Anschließend wurden sie auf 2 YPD-Medium-haltige Erlenmeyerkolben verteilt, wobei einer der beiden eine Geneticin-Konzentration von 4 mg/ml enthielt. Bei beiden Kulturen zeigte sich eine deutliche Zellvermehrung. Nach 3tägigem Wachstum wurden die Zellen in je drei MM-haltige Kolben überführt. Diese Kolben wurden ohne Geneticin, bzw. mit einer Geneticin-Konzentration von 0,4 bzw. 4 mg/ml inkubiert, so dass 6 verschiedene Ansätze entstanden:

YPD ohne G418						2 d
YPD ohne G418			YPD mit G418 = 4 mg/ml			3 d
MM ohne G418	MM mit G418 = 4 mg/ml	MM mit G418 = 0,4 mg/ml	MM ohne G418	MM mit G418 = 4 mg/ml	MM mit G418 = 0,4 mg/ml	4 d
Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6	

Nach einer Expressionsdauer von 4 Tagen wurden Proben entnommen und mittels Western Blot ausgewertet. Dabei wurde für Ansatz 5 (Kontrolle) eine starke Bande auf einer Höhe von etwa 37 kDa beobachtet (Abb. 14). Bei allen anderen Ansätzen war eine entsprechende Bande im Western Blot nicht nachweisbar. Eine Probe aus Ansatz 5 diente für die folgenden Western Blots als Positivkontrolle.



Abb. 14: Western Blot mit Proben aus den Ansätzen 1-6.

Es wurde eine starke Bande bei Ansatz 5 auf einer Höhe von. 37 kDa nachgewiesen. Bei allen anderen Ansätzen war eine entsprechende Bande nicht nachweisbar. Primärantikörper: Anti-myc-tag 1:1000 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-mouse 1:2000 in TBST.

Nach der Optimierung der Expressionsbedingungen in Vorexperimenten wurde für die folgenden Expressionen von rFGF-BP folgende Parameter festgelegt:

Die Hefen wurden in YPD-Medium herangezogen und nach 2 Tagen in Geneticin-haltiges YPD-Medium (4 mg/ml) für weitere 3 Tage inkubiert. Nach Trennung des Mediums von den Zellen mittels Zentrifugation wurden letztere in Geneticin-haltigem (4mg/ml) Expressionsmedium (MM) resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 1

eingestellt. Nach 4 Tagen Expression wurden die Zellen abzentrifugiert und der rFGF-BP-haltige Überstand bei 4°C aufbewahrt.

4.3.2 Anreicherung von FGF-BP aus dem Expressionsmedium

Zur Konzentration und partiellen Reinigung von rFGF-BP aus dem Expressionsmedium wurden verschiedene Methoden angewandt und verglichen.

Das Expressionsmedium wurde durch Zentrifugation von den Hefezellen getrennt und bezogen auf die Ausgangskonzentration im Expressionsmedium um den Faktor 40 über Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HSA) (2 Eluatfraktionen: HSA-E1-rFGF-BP und HSA-E2-rFGF-BP), Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-rFGF-BP) bzw. Centricon-Röhrchen (Centricon-rFGF-BP) angereichert und im Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde eine Probe des Überstandes aus Ansatz 5 (s.o.) mitgeführt.

Dabei konnten bei dem über Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereicherten rFGF-BP sowie bei der 2. Eluatfraktion der Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie keine Signale detektiert werden. Bei der 1. Eluatfraktion konnte eine schwache Bande, bei der Einengung über Centricon-Röhrchen dagegen eine intensive Bande beobachtet werden, die beide Male einer Größe von 37 kDa entsprach (Abb.15).

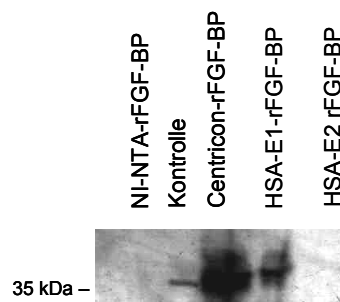


Abb. 15: Western Blot der angereicherten rFGF-BP-haltigen Expressionsmedien. Die stärkste Bande auf einer Höhe von 37 kDa zeigte sich bei dem über Centricon-Röhrchen angereicherten Medium (Centricon-rFGF-BP) sowie beim ersten Eluat der Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HSA-E1-rFGF-BP). Dagegen war eine entsprechende Bande weder beim 2. Eluat der HSA (HSA-E2-rFGF-BP) noch bei dem über Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereicherten Medium nachweisbar (Ni-NTA-rFGF-BP). Primärantikörper: Anti-myc-tag 1:1000 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-mouse 1:2000 in TBST.

Der Durchlauf der Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie wurde im Anschluss an dieses Experiment seinerseits um den Faktor 40 über Centricon-Röhrchen (HSA-Centricon-rFGF-BP) eingengt und mit den Bandenintensitäten des nativen Überstands, der 1. Eluatfraktion der Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie (HSA-E1-rFGF-BP) und des über Centricon eingengten rFGF-BPs (Centricon-rFGF-BP) verglichen. Auch hier zeigte sich die stärkste Bande auf einer Höhe von ca. 37 kDa bei dem Centricon-eingengten Überstand vor der Reinigung. Auch bei dem über Centricon-Röhrchen eingengten Durchlauf aus der Heparin-Sepharose-Affinitätsreinigung zeigte sich eine Bande im Western Blot, die weitaus intensiver war, als die der 1. Eluatfraktion (Abb. 16). Demnach scheint keine Bindung von rFGF-BP an Heparin-Sepharose zu erfolgen.

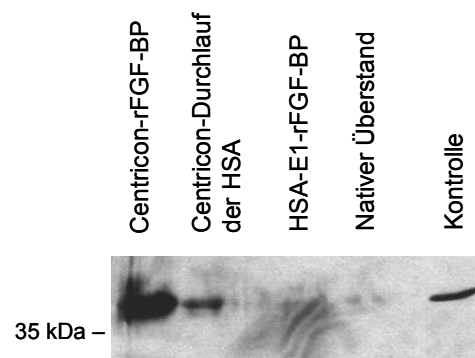


Abb. 16: Western Blot des über Centricon-Röhrchen konzentrierten rFGF-BPs aus dem Durchlauf der HSA im Vergleich.

Die stärkste Bande fand sich auch hier bei dem über Centricon-Röhrchen ankonzentriertem Überstand vor der Reinigung (Centricon-rFGF-BP). Ebenso wurde eine starke Bande bei dem über Centricon-Röhrchen ankonzentriertem Durchlauf der HSA beobachtet (Centricon-Durchlauf der HSA), die weitaus intensiver als die der 1. Eluatfraktion der HSA erscheint (HSA-E1-rFGF-BP). Eine Bindung von rFGF-BP an Heparin-Sepharose scheint nicht zu erfolgen. Primärantikörper: Anti-myc-tag 1:1000 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-mouse 1:2000 in TBST.

Da bei dahin durchgeführten Western Blots lediglich auf das Vorhandensein von rFGF-BP im Medium getestet wurde, konnte keine Aussage bezüglich der Proteinreinheit gemacht werden. Um alle in dem Expressionsmedium enthaltene Proteine darzustellen und die beiden Anreicherungsverfahren HSA und Centricon-Röhrchen bezüglich ihrer Spezifität zu vergleichen, wurde eine Silver stain- bzw. eine Coomassie-Färbung von SDS-Gelelen durchgeführt.

In beiden Fällen fanden sich bei der Eluatfraktion der HSA (HSA-E1-rFGF-BP) weitaus weniger unspezifischer Banden als bei dem über Centricon-Röhrchen

eingeeengten Expressionsmedium (Centricon-rFGF-BP) (Abb. 17). Bei der Anreicherung von rFGF-BP über die Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie werden spezifische Affinitätseigenschaften von rFGF-BP genutzt, die jedoch zu geringeren rFGF-BP-Ausbeuten führten. Dagegen richtet sich die Anreicherung über Centricon-Röhrchen lediglich nach der Proteingröße, so dass hier neben rFGF-BP auch einige unspezifische Proteine nachweisbar sind, allerdings war die rFGF-BP-Konzentration wesentlich höher.

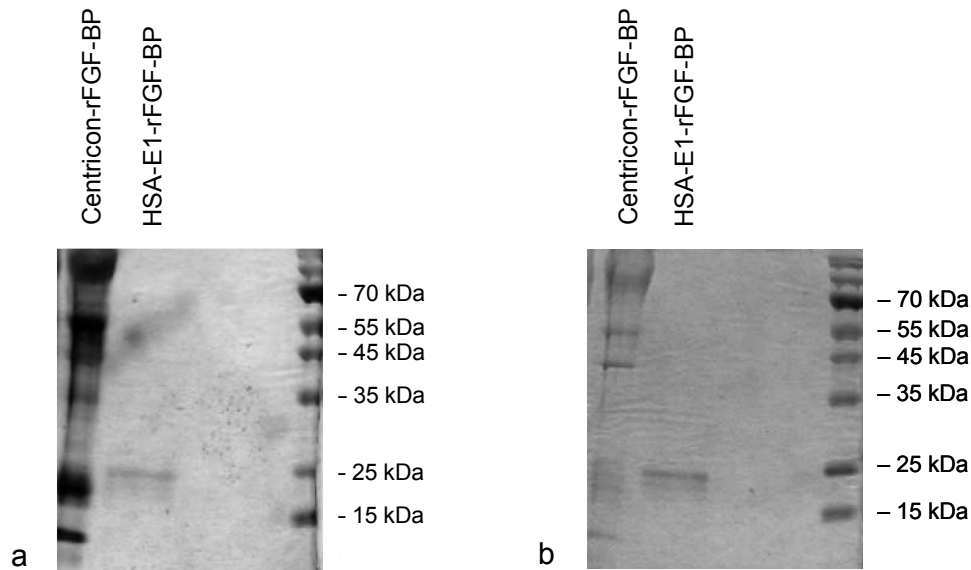


Abb. 17: Gelelektrophorese mit Silver stain bzw. Coomassie-Färbung des angereicherten rFGF-BPs.

Bei dem über Centricon-Röhrchen eingeeentem Expressionsmedium (Centricon-rFGF-BP) sind deutlich mehr unspezifische Banden nachweisbar verglichen mit der Eluatfraktion aus der HSA (HSA-E1-rFGF-BP).

4.3.3 FGF-BP-Signaldetektion im Western Blot mit verschiedenen Antikörpern

Da der bisher für die Western Blot-Analysen verwendete Anti-myc-tag-Antikörper nur indirekt FGF-BP über den myc-tag identifizieren konnte, wurden im Folgenden zwei FGF-BP spezifische Antikörper (kommerziell erhältliches Anti-FGF-BP und Anti-FGF-BP (T)) verwendet. Analysiert wurden dabei die 1.Eluatfraktion der HSA und das über Centricon-Röhrchen eingeeengte Expressionsmedium.

Der Anti-myc-tag-Antikörper detektierte Banden auf einer Höhe von ca. 37 kDa sowohl in der Eluatfraktion (HSA-E1-rFGF-BP, schwache Signale), als auch im über Centricon-Röhrchen eingeeengtem Expressionsmedium (Centricon-rFGF-BP, starke Signale) (s. Abb.15).

Unter Verwendung der beiden FGF-BP-spezifischen Antikörper zeigte sich eine starke Bande auf der Höhe von 37 kDa jedoch nur bei dem über Centricon-Röhrchen eingeengten Expressionsmedium (Centricon-rFGF-BP) (Abb. 18).

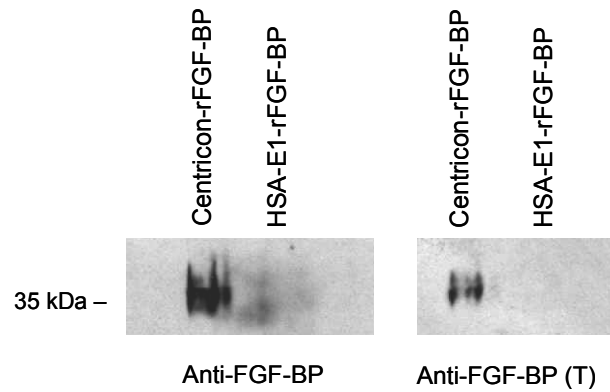


Abb. 18: Western Blots mit spezifischen FGF-BP-Antikörpern.

Eine intensive Bande bei 37kDa ist durch beide Antikörper nur bei dem über Centricon-Röhrchen eingeengten Expressionsmedium(Centricon-rFGF-BP) nachweisbar.

Primärantikörper: kommerziell erhältliches Anti-FGF-BP 1:250 in TBST bzw. Anti-FGF-BP (T) 1:100 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-Maus 1:2000 in TBST bzw. Anti-Kaninchen 1:2500 in TBST.

4.3.4 Untersuchung der FGF-BP-Proteinstabilität in Abhängigkeit von Temperatur und Proteaseinhibition

Um die Stabilität von rFGF-BP in Hinsicht auf Temperatur und Proteasen zu testen, wurden Proben des über Centricon-Röhrchen eingeeengten Expressionsmediums (Centricon-rFGF-BP) wie folgt behandelt:

Ansatz	Protease-inhibition	Inkubations-Temperatur	Inkubations-Zeit
1	Ja	37°C	90 min
2	Nein	37°C	90 min
3	Ja	RT	48 h
4	Nein	RT	48 h
5	Ja	4°C	48 h
6	Nein	4°C	48 h
7	Ja	-20°C	48 h
8	Nein	-20°C	48 h

Zur Analyse wurde ein Western Blot durchgeführt, wobei FGF-BP über den myc-tag-Antikörper detektiert wurde (Abb. 19). Die Bandenintensitäten der behandelten Proben waren übereinstimmend, so dass weder die Proteaseinhibition noch die Lagerung bei einer bestimmten Temperatur für die Stabilität des rFGF-BPs von wesentlichem Einfluss war.

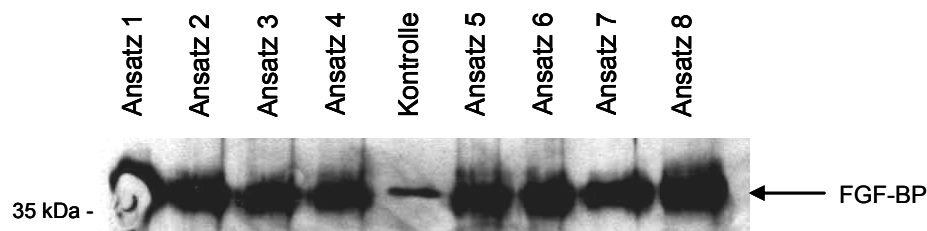


Abb. 19: Western Blot mit rFGF-BP-haltigen Proben aus den Ansätzen 1-8. Bei allen Proben zeigt sich eine ähnlich intensive Bande bei 37 kDa. Eine Proteaseinhibition bzw. Lagerung der Proben bei bestimmten Temperaturen nimmt keinen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität von rFGF-BP. Primärantikörper: Anti-myc-tag 1:1000 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-Maus 1:2000 in TBST.

4.3.5 Liganden-Dot-Blot mit FGF-BP und verschiedenen FGFs

Um die Bindungseigenschaften des rekombinant produzierten rFGF-BPs aus *Pichia pastoris* an verschiedene FGFs zu untersuchen, wurde ein Liganden-Dot-Blot durchgeführt. Als Bindepartner für rFGF-BP wurden je 2 µl von FGF-2, -4, -7 bzw. -9 mit einer Konzentration von je 0,1 µg/µl auf eine Nitrozellulose-Membran pipettiert. Als Negativkontrolle wurde BSA in gleicher Menge und Konzentration mitgeführt. Das verwendete rFGF-BP stammte aus dem über Centricon-Röhrchen eingegengtem Expressionsmedium.

Nach Detektion des gebundenen rFGF-BP über den myc-tag-Antikörper wurde ein starkes Signal bei FGF-4 sowie etwas schwächere aber dennoch deutliche Signale bei FGF-2 und FGF-9 detektiert. Bei FGF-7 wurde keine Interaktion mit rFGF-BP beobachtet, ebenso wenig bei der BSA-Kontrolle (Abb.20).



Abb. 20: Liganden-Dot-Blot von rFGF-BP mit FGF-9, -7, -4, -2 und BSA.

Die stärkste Detektion von rFGF-BP wurde bei FGF-4 beobachtet, eine schwächere bei FGF-2 und -9. Eine Interaktion von rFGF-BP mit FGF-7 bzw. BSA konnte nicht nachgewiesen werden. Primärantikörper: Anti-myc-tag 1:1000 in TBST, Sekundärantikörper: Anti-Maus 1:2000 in TBST.

4.3.6 Nachweis der biologischen Aktivität in SW13- Zellen

Um die Bioaktivität des rFGF-BP aus *Pichia pastoris* zu prüfen, wurden SW13-Zellen verwendet, da diese Zellen kein endogenes FGF-BP exprimieren, jedoch durch stabile Transfektion mit einem FGF-BP-Expressionsvektor in ihrem Wachstum stimuliert werden (s.4.2.6).

Mit SW13-Zellen wurde ein Soft-Agar-Assay in 12-Well-Platten durchgeführt, wobei ca. 13.000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Anschließend wurden auf den festgewordenen Agar verschiedene Mengen des rekombinanten, über Centricon-Röhrchen eingegengten rFGF-BP bzw. als Negativkontrolle ebenfalls über Centricon-Röhrchen eingegengtes Kontrollmedium (MM) pipettiert. Es wurden Konzentrationen von 5 µg/ml, 12,5 µg/ml bzw. 50 µg/ml in einem Endvolumen von 100 µl appliziert, welches durch die entsprechende Zugabe von PBS erreicht wurde. Zusätzlich wurden

für den Soft-Agar-Assay mit FGF-BP stabil transfizierte SW13-Zellen (BP stabil) verwendet und mit 50 µg/ml des rFGF-BP in 100 µl Endvolumen, 100 µl PBS bzw. 100 µl MM behandelt. Zum Ausschluss eines wachstumstimulierenden Effekts durch MM wurden zur Kontrolle ferner SW13-Wildtyp-Zellen (WT) bzw. mit FGF-BP stabil transfizierte SW13-Zellen (BP stabil) mit 100 µl PBS versetzt. Nach einer Inkubationszeit von drei Wochen unter Standardbedingungen wurden Kolonien ab einer Größe von 50 µm ausgezählt.

Dabei zeigte sich eine deutlich gesteigerte Kolonienbildung der mit 5 µg/ml und 12,5 µg/ml rekombinanten FGF-BP behandelten Zellen gegenüber ihren jeweiligen Kontrollen ebenso wie gegenüber den mit den PBS behandelten SW13- Zellen. Bei den mit jeweils 50 µg/ml rFGF-BP bzw. MM versetzten Zellen wurde im Gegensatz dazu ein deutlich inhibierender Effekt beobachtet, verglichen mit den unbehandelten SW13- Zellen. Diese Tendenz fiel auch bei den mit dem FGF-BP-Expressionsvektor stabil transfizierten Zellen auf, zu denen 50 µg/ml des rekombinanten FGF-BP bzw. 100 µl MM zugegeben worden waren. Die unbehandelten FGF-BP-exprimierenden Zellen zeigten dagegen eine erwartungs-gemäß erhöhte Wachstumsrate, vergleichbar mit dem stimulierenden Effekt des exogen addierten rekombinanten FGF-BP in einer Menge von 5 bzw. 12,5 µg/ml (Abb. 21).

Der beobachtete wachstumsinhibierende Effekt bei Addition von 50 µg/ml rFGF-BP bzw. MM auf die SW13-Zellen scheint durch die Ansäuerung des Wachstumsmediums bei Zugabe größerer Mengen von MM-Medium bedingt zu sein. Dabei wird das Zellwachstum unabhängig von der in dem zugegebenen MM-Medium enthaltenen rFGF-BP-Menge gehemmt.

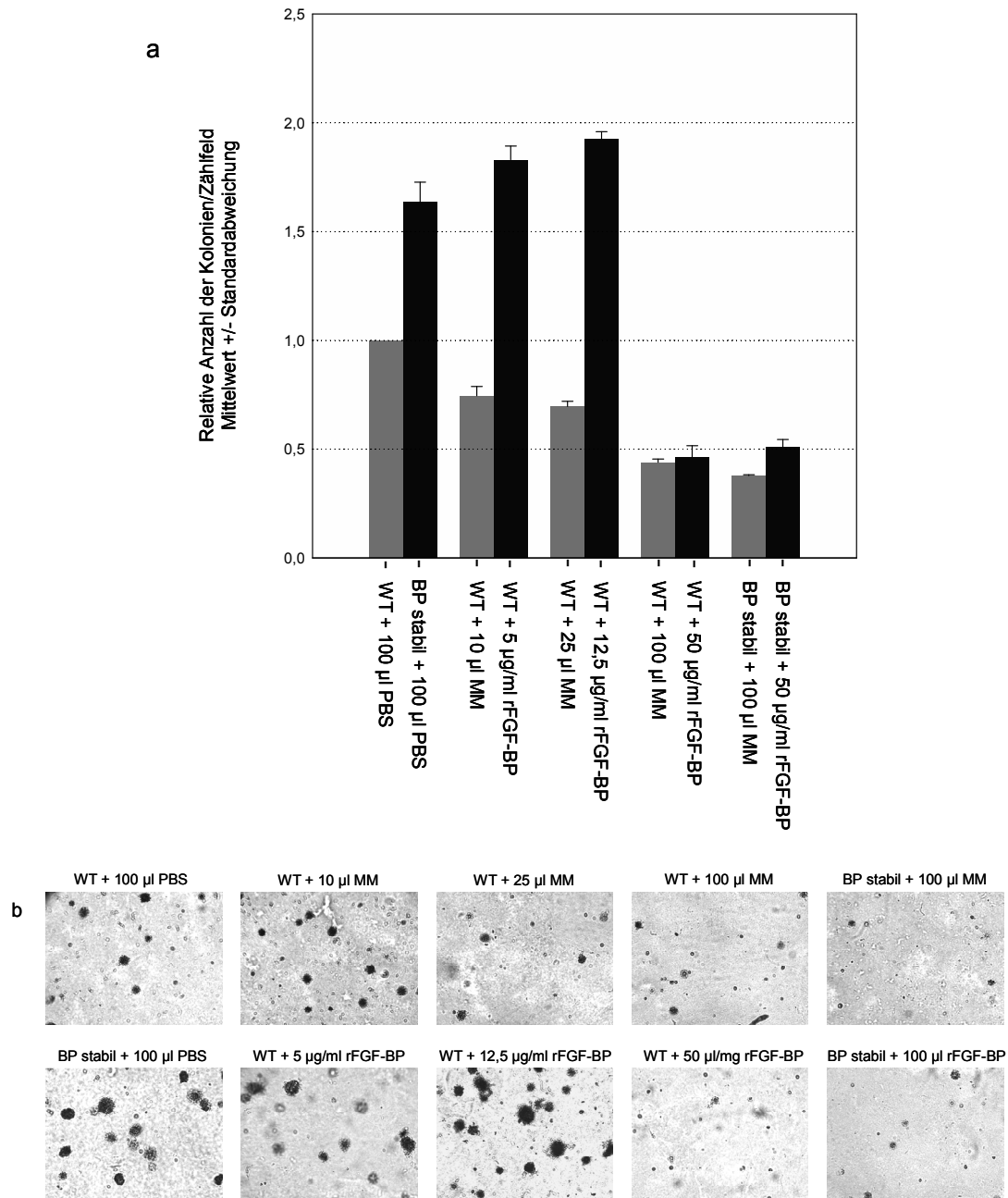


Abb. 21: Soft-Agar-Assay mit SW13-Wildtyp-Zellen (WT) bzw. mit FGF-BP stabil transfizierten SW13-Zellen, mit oder ohne Zugabe von rFGF-BP.

oben: Graphische Auswertung des Soft-Agar-Assays bezogen auf die Kolonienzahl der mit 100 μ l PBS behandelten SW13-Wildtypzellen (= 1.0). unten: Repräsentative photographische Darstellung der ausgewerteten Soft-Agar-Assay-Kolonien.

5 Diskussion

Die Erkrankung an malignen Tumoren ist eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Ländern (Landis et al., 1999). Betrachtet man dabei isoliert die malignen Tumoren aus dem gynäkologischen Bereich, steht das Mammakarzinom die Inzidenz betreffend an erster Stelle. Der gynäkologische Tumor mit der schlechtesten 5-Jahres-Überlebensrate ist jedoch das Ovarialkarzinom (Landis et al., 1999), nicht zuletzt weil es häufig erst in einem vergleichsweise fortgeschrittenem Krankheitsstadium diagnostiziert wird. Umso wichtiger ist die Analyse der Pathogenese des Ovarialkarzinoms auf molekularer Ebene und die Identifikation von Tumorzellen überexprimierter Proteine, die Angriffspunkte für einen spezifischen und nebenwirkungsarmen Einsatz von Medikamenten darstellen könnten.

Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Analyse des Expressionsstatus und zellulären Funktion eines FGF-Bindeproteins (FGF-BP), einem in verschiedenen karzinomatös entarteten Geweben überexprimiertes Genprodukt.

In früheren Studien wurde bereits der Einfluß von FGF-2 auf das Wachstum verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien untersucht. Dabei führte die exogene Applikation von FGF-2 in die jeweiligen Kulturmedien bei allen drei Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation (Crickard et al., 1994). Andere Studien berichten von einer Aktivierung von extrazellulär gebundenem FGF-2 durch ein FGF-Bindeprotein (FGF-BP) in verschiedenen Zelllinien (Czubayko et al., 1997; Czubayko et al., 1994), sowie von einer Überexpression von FGF-BP in einer Reihe von malignen Tumoren wie z.B. Karzinomen des Gastrointestinaltrakts (Tassi et al., 2006) und Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Czubayko et al., 1994). Diese Datenlage legte die vergleichende Analyse des Expressionsstatus von FGF-BP in gesundem und malignem Ovarialgewebe nahe.

Diesbezüglich wurden Gewebeschnitte (Multi-Tissue-Arrays) gesunden als auch maligne entarteten Ovarialgewebes immunhistochemisch unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen humanes FGF-BP untersucht und die Intensität der jeweiligen immunhistochemischen Färbung verglichen. Es zeigte sich in allen Ovarialgeweben ein heterogenes Verteilungsmuster von FGF-BP, wobei die Gesamtfärbeintensität bei den gesundem Ovarialgewebeschnitten negativ oder schwach (0-1), bei den malignen Gewebeschnitten schwach bis stark (1-4) ausgeprägt

war. Um eine Unterscheidung zwischen einer normalen und einer erhöhten Expression von FGF-BP in den Gewebeschnitten zu ermöglichen, wurden Farbintensitäten von 0-2 als normale Expression und Werte von 3 und 4 als Überexpression bewertet. Die Farbeintensität 2 wurde zwar bei keinem der gesunden Ovarialgewebeproben beobachtet, im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der Resultate wurde sie dennoch als erhöhte Expression von FGF-BP interpretiert, so dass der Anteil der Gewebeproben mit einer Überexpression von FGF-BP eher unterschätzt wurde.

Das primäre ovariale Adenokarzinom ist in seinem Erscheinungsbild und seiner Pathologie eine heterogene Erkrankung. Es werden morphologisch 4 Haupttypen unterschieden: das seröse, muzinöse, endometroide und das Klarzellkarzinom. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Gewebeschnitten war in der Mehrheit eine klare Unterscheidung der Karzinomsubtypen anhand der Morphologie nicht möglich, so dass keine Aussage über das Verhältnis der FGF-BP-Expression bezüglich des Karzinomsubtyps getroffen werden kann. Deshalb wurde der Schwerpunkt dieser Analyse auf den Vergleich des Expressionsstatus von FGF-BP zwischen gesundem und maligne entartetem Ovarialgewebe unabhängig von der Morphologie gelegt. Dabei konnte eine Überexpression von FGF-BP in ca. 30% der Ovarialkarzinome nachgewiesen werden. Dieser Anteil entspricht in etwa der Überexpressionsrate von Her2, einem Wachstumsfaktorrezeptor, der in ca. 25% aller Mammakarzinome überexprimiert wird. Betroffene Patientinnen können hier von einer Therapie mit einem humanisierten Antikörper (Trastuzumab) gegen diesen Rezeptor profitieren. Dabei wird durch die Beeinflussung der intrazellulären Signalweiterleitung das Zellwachstum gehemmt und die Prognose der Patientinnen verbessert.

Dieser Vergleich verdeutlicht das mögliche Potential einer Therapie gegen das Zielgen bzw. -protein FGF-BP im Hinblick auf die Prognoseverbesserung bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht daher die Funktionsanalyse des FGF-BP.

Viele vorangegangene Untersuchungen identifizierten FGF-BP als aktivierenden Faktor für extrazellulär gebundenes FGF-2. Um diesem Aktivitäts-Mechanismus spezifisch auf molekularer Ebene nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit das subzelluläre Verteilungsmuster und die Funktionen des FGF-BP auf zellulärer Ebene analysiert, die sich aus seiner Wechselwirkung mit FGF-2 ergeben. Dabei wurden

insbesondere die konfokale Lasermikroskopie sowie die Analyse von kontaktunabhängigem Zellwachstum im Soft-Agar-Assay verwendet.

Bei der konfokalen Lasermikroskopie wird mit Proteinen gearbeitet, die nach Anregung durch UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge in verschiedenen Farben fluoreszieren, wie z.B. GFP (green fluorescent protein) und seine in dieser Arbeit verwendeten Varianten CFP (cyan fluorescent protein) und YFP (yellow fluorescent protein). Diese Proteine können mit dem C- oder N-Terminus von interessierenden Proteinen fusioniert werden. Die Funktion und das intrazelluläre Verteilungsmuster dieser Fusionsproteine wird dabei durch das zu untersuchende Protein bestimmt. Bereits in früheren Studien wurden diese Fusionsproteine erfolgreich verwendet, um die subzelluläre Lokalisation und den intrazellulären Transportweg von bestimmten Proteinen in lebenden Zellen zu analysieren (Michigami et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden Expressionsvektoren von full length FGF-BP und einigen C- bzw. N-terminal verkürzten Formen konstruiert, deren C-Terminus mit einem für CFP kodierenden Fragment fusioniert wurde. FGF-BP ist ein lösliches, sekretiertes Protein mit einem N-terminalen Signalpeptid (Wu et al., 1991), welches in den N-terminal verkürzten Mutanten beibehalten wurde. Dadurch wurde der Erhalt von Signalpeptid-abhängigen Interaktionen und Sekretionswegen garantiert und Fehlinterpretationen der Resultate aufgrund der Abwesenheit des Signalpeptids in den N-terminal verkürzten Mutanten ausgeschlossen.

Das Signalpeptid ist für den ko- oder posttranslationalen Import des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) verantwortlich (Rapoport et al., 1996). In vom ER abgeschnürten Vesikeln gelangen sekretorische Proteine zunächst zur weiteren Modifikation zum Golgi-Apparat und im Anschluß durch vesikulären Transport an die Zelloberfläche, wo die Exozytose stattfindet (Nickel et al., 2002; Rothman and Wieland, 1996; Schekman and Orci, 1996). Der Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat gelingt über ein Zwischenkompartiment (Endoplasmatic Reticulum-Golgi intermediate compartment ERGIC). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FGF-BP zunächst im Zytoplasma und im ERGIC, welches durch das ERGIC-spezifische Markerprotein ERGIC-53 (Hauri et al., 2000) nachgewiesen wurde, lokalisiert ist. Damit wird FGF-BP über den klassischen Weg sekretiert und kann folglich mit extrazellulär gebundenem FGF-2 interagieren. Daneben findet sich

allerdings auch eine nukleäre Lokalisation von FGF-BP trotz Signalpeptid, welche allerdings von der Anwesenheit von intrazellulärem FGF-2 abhängt.

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von FGF-BP und der hierfür verantwortlichen Proteinsequenz bei Koexpression von FGF-2 und ihrer zellbiologischen Auswirkungen wurden im Folgenden zwei Zelllinien verwendet. Beide Linien, COS7 (Affenfibroblasten) und die humane Nebennierenkarzinomzelllinie SW13, exprimieren endogen kein FGF-BP (Czubayko et al., 1994) und sind somit für die Analyse der Interaktionen von FGF-BP und seiner Verkürzungsmutanten mit FGF-2 gut geeignet.

FGF-2 existiert in 5 Isoformen mit Molekulargewichten von 18, 22, 22.5, 24 und 34 kDa. Sie basieren auf einer gemeinsamen mRNA und entstehen durch unterschiedliche Translationsinitiationen (Arnaud et al., 1999). In früheren Studien wurde die 18kDa-Form als hauptsächlich im Zytosol lokalisiertes Protein ohne Präsenz einer Signalsequenz beschrieben (Bugler et al., 1991; Monzat et al., 1996; Renko et al., 1990). Dieses Protein gelangt über einen vom Signalpeptid unabhängigen, alternativen Sekretionsweg in den Extrazellularraum und wird dort gespeichert. Die höhermolekularen Isoformen sind dagegen im Wesentlichen im Zellkern lokalisiert (Delrieu, 2000; Quarto et al., 1991), wofür N-terminal gelegene Aminosäuresequenzen (Nukleus-lokalisierende Sequenz, NLS) verantwortlich sind (Amalric et al., 1994; Quarto et al., 1991). Aufgrund der vorbeschriebenen Aktivierung des extrazellulär gespeicherten FGF-2 durch FGF-BP und ihrer zytoplasmatische Lokalisation wurde die 18kDa-Isoform verwendet, um das subzelluläre Verteilungsmuster und die Interaktion von FGF-BP mit FGF-2 zu analysieren.

Dabei wurde interessanterweise zunächst eine deutliche nukleäre Lokalisation von FGF-2 mit besonders stark ausgeprägter Anreicherung in den Nukleoli beobachtet. Die Translokation der 18kDa-Isoform des FGF-2 scheint über einen NLS-unabhängigen Mechanismus in den Zellkern zu erfolgen, wobei FGF-BP als Carrierprotein eine wichtige Rolle spielt. Denkbar ist auch die Existenz einer im Vergleich zu den anderen Isoformen alternative NLS.

Unter Koexpression von FGF-2 findet in COS7-Zellen eine Translokation des zytoplasmatisch lokalisierten FGF-BP in den Zellkern statt. Diese nukleäre

Lokalisation von FGF-BP konnte in der endogen FGF-2 exprimierenden Tumorzelllinie SW13 bestätigt werden. FGF-BP scheint neben der Aktivierung von extrazellulär gespeichertem FGF-2 auch eine intrazelluläre Funktion basierend auf seiner Interaktion mit FGF-2 im Zellkern zu haben.

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung C- bzw. N-terminal verkürzter FGF-BP-Mutanten Untersuchungen zur Identifikation der bindingsrelevanten Fragmente des FGF-BP hinsichtlich seiner Interaktionen mit FGF-2 durchgeführt. Interessanterweise ging bei dieser Analyse mit dem Verlust der N-terminalen Sequenz des FGF-BP der Verlust der FGF-2-abhängigen Translokation des FGF-BP in den Zellkern einher. Die Translokation von FGF-BP in den Zellkern ist demnach zum einen von dessen N-Terminus und zum anderen von der Anwesenheit von FGF-2 abhängig. Diese Beobachtung widerspricht dem Ergebnis von Xie et al. Sie identifizierten die für die Bindung von FGF-BP an FGF-2 verantwortliche Sequenz des FGF-BP im Bereich dessen C-Terminus (Xie et al., 2006).

Um die biologische Relevanz der Interaktion von FGF-BP und seiner Verkürzungsmutanten mit FGF-2 zu untersuchen, wurden Soft-Agar-Assays mit den stabil transfizierten Zellen COS7 und SW13 durchgeführt. Bei dieser Form der Zellkultur ist kontaktunabhängiges Wachstum möglich, welches mit der Tumorigenität einiger Zelltypen korreliert und deren Wachstumsbedingungen am ehesten den natürlichen entspricht. Bei den mit dem FGF-BP stabil transfizierten, endogen FGF-2 exprimierenden SW13-Zellen wurde eine erhöhte Wachstumsrate der Zellen beobachtet. Dieser Effekt wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben (Czubayko et al., 1996; Liaudet-Coopman and Wellstein, 1996) und konnte durch Addition eines spezifischen Antikörpers gegen FGF-2 gehemmt werden (Czubayko et al., 1994), was für eine FGF-2-abhängige Wachstumsstimulation des FGF-BP spricht.

Abhängig von der Zelllinie zeigten sich in dieser Arbeit jedoch unterschiedliche biologische Funktionen von FGF-BP. In COS7-Zellen, die endogen kein FGF-2 exprimieren und wo ohne FGF-2 keine Translokation von BP in den Kern stattfindet, fand sich eine FGF-BP-abhängige Wachstumsinhibition, die allerdings nur bei der unverkürzten Form beobachtet werden konnte. Bei den endogen FGF-2 exprimierenden SW13-Zellen fand sich eine Stimulation des Zellwachstums, welche

abhängig von der Anwesenheit des N-Terminus von FGF-BP war. Zusammengefasst mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie zeigt sich, dass in Abhängigkeit von der Anwesenheit von FGF-2 und des N-Terminus von FGF-BP eine Translokation des letzteren in den Zellkern stattfindet, was zu einem wachstumstumsstimulierenden Effekt führt. Dagegen findet in Abwesenheit von FGF-2 keine Translokation von FGF-BP in den Zellkern statt, es verbleibt also im Zytoplasma und dieses zytoplasmatische FGF-BP wirkt wachstumsinhibierend.

Chen et al. 2001 beschrieben in einer früheren Studie ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von FGF-BP in hohen Mediumkonzentrationen auf das Wachstum von Maus-Fibroblasten über eine Hemmung der DNA-Synthese und erklärten diese Beobachtung durch die Bildung von Komplexen aus FGF-BP und FGF-2, die über eine Reduktion von freiem FGF-1 und -2 zu einer insuffizienten Stimulation der DNA-Synthese und daraus resultierendem vermindertem Zellwachstum führen.

Die beobachtete FGF-BP-vermittelte Inhibition auf das Wachstum vom COS7-Zellen im Soft-Agar-Assay wurde weder bei den N-terminal noch bei den C-terminal verkürzten Mutanten beobachtet. Für diese wachstumsinhibitorische Funktion scheint demnach die vollständige Sequenz des full length FGF-BP verantwortlich zu sein.

FGF-BP in reproduzierbar großen Mengen rekombinant herzustellen, stellte sich bereits in früheren Arbeiten als schwierige Aufgabe heraus (Schneeweiß und Aigner, unveröffentlichte Daten). Die rekombinante Expression größerer Mengen von FGF-BP war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht etabliert.

So erbrachte die Verwendung eines bakteriellen Wirtssystems zur Expression eines Glutathiontransferase-FGF-BP-Fusionsproteins als auch die rekombinante Expression von FGF-BP in Insektenzellen und *Pichia pastoris* nur geringe Ausbeuten (Aigner, unveröffentlichte Daten). Eine Problematik bei der Verwendung dieser Expressionssysteme beruhte auf der fehlenden Löslichkeit des intrazellulär verbleibenden FGF-BP. Eine Sezernierung des rekombinanten Proteins mit einem Wirtssystem aus *Pichia pastoris* und einem entsprechenden Expressionsvektor bringt einige Vorteile mit sich. Zum einen liegt das Protein in reiner Form vor, da *Pichia pastoris* nur geringe Mengen an anderen, unerwünschten Proteinen sezerniert und das Expressionsmedium (MM) keine Proteine enthält. Dadurch können bei der Aufreinigung auf denaturierende Prozesse verzichtet werden, die eine spätere

Rückfaltung der Proteine notwendig machen würde. Zum anderen herrscht extrazellulär ein oxidierendes Milieu, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins erleichtert.

Die Expression von sekretiertem FGF-BP ermöglichte die Aufreinigung von FGF-BP aus dem konditionierten Expressionsmedium und verbesserte die Ausbeute. Die Aufreinigung erbrachte initial allerdings trotz der optimierten Expressionsbedingungen nur geringe Proteinmengen. Die Zugabe von Geneticin zum Medium ermöglichte die Erfassung von *Pichia-pastoris*-Klonen mit hohen FGF-BP-Expressions-Raten, da die Geneticin-Resistenz von der Anzahl der Inserts abhängt (Gendosiseffekt). Um höhere Konzentrationen von FGF-BP zu erhalten, wurden Proben des Expressionsmediums mit Hilfe von Centricon-Röhrchen eingengt. Die spezifische Aufreinigung unter Verwendung der Affinitätschromatographie führte entgegen der Erwartungen zu geringen FGF-BP-Ausbeuten. Ursachen könnten hierbei eine schlechte Bindung des Proteins an das Säulenmaterial und/oder eine geringe Stabilität sein. So wurde aufgrund der höheren FGF-BP-Konzentration in der mit Centricon-Röhrchen eingengten Fraktion diese für weitere in-vitro-Studien verwendet.

In früheren Studien wurde von Interaktionen von FGF-BP mit FGF-1, -2, -7, -10 und -22 (Beer et al., 2005) berichtet. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimierten FGF-BP wurde die Bindung mit FGF-2 im Liganden-Dot-Blot bestätigt. Darüber hinaus konnte die Bindung mit FGF-4 und -9 nachgewiesen werden. Die früher beobachtete Interaktion von FGF-BP und FGF-7 (Beer et al., 2005) bestätigte sich nicht.

Die biologische Aktivität von rFGF-BP wurde im Soft-Agar-Assay mit endogen FGF-2-produzierenden SW13-Zellen untersucht. Eine exogene Applikation von rFGF-BP auf einen Soft-Agar-Assay führte bei Konzentrationen von 5 und 12,5 µg/ml zu einer Wachstumsinduktion. Jene rFGF-BP abhängige Proliferationssteigerung wurde schon bei früheren Studien (Tassi et al., 2001) bei gleichzeitiger Applikation von exogenem FGF-2 nachgewiesen, wobei hier NIH-T3T-Fibroblasten und von Insektenzellen produziertes FGF-BP verwendet wurden. Aigner et al. konnten eine Wachstumsstimulation von rFGF-BP unabhängig von exogen zugeführtem FGF-2 nachweisen und führten diese Beobachtung auf die Interaktion von rFGF-BP mit endogenem FGF-2 zurück (Aigner et al., 2001). Die Applikation höherer

Konzentrationen (50 µg/ml) des rFGF-BP führte in dieser Arbeit jedoch zur Wachstumsinhibition der SW13-Zellen.

Zusammengenommen mit den Beobachtungen aus der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie und den vorhergehenden Soft-Agar-Assays scheint das Gleichgewicht zwischen FGF-BP und FGF-2 für die unterschiedliche Wirkung auf das Zellwachstum verantwortlich zu sein. FGF-BP bindet an FGF-2 und gelangt so in den Zellkern, wo es eine proliferationssteigernde Wirkung entfaltet. In Abwesenheit von FGF-2 verbleibt es im Zytoplasma und wirkt dann inhibitorisch auf das Zellwachstum. Demnach ist denkbar, dass ein Ungleichgewicht von FGF-BP und FGF-2 zugunsten von FGF-BP zu einem relativen Überschuß von ungebundenem FGF-BP führt, welches im Zytoplasma verbleibt und das Zellwachstum hemmt.

Die wachstumsstimulierende Wirkung von FGF-BP ist demnach von mehreren Faktoren abhängig: Zum einen von der Anwesenheit von FGF-2, zum anderen vom N-Terminus des FGF-BP und schließlich von dem Gleichgewicht des zytoplasmatischen, inhibitorisch wirksamen und des nukleären, stimulierenden FGF-BP.

Aus diesen Daten ergibt sich die mögliche Bedeutung des FGF-BP im Hinblick auf therapeutische Möglichkeiten und die Prognose von Ovarialkarzinomen. Im Zentrum könnte hierbei die Hemmung des Zellwachstums durch die Beeinflussung des o.g. Gleichgewichts zwischen zytoplasmatischem und nukleärem FGF-BP stehen, z.B. durch den Einsatz katalytischer RNA (siRNA, Ribozyme).

6 Zusammenfassung

Nach Herz-Kreislaferkrankungen stellen maligne Tumoren die zweithäufigste Todesursache in den Industriestaaten dar. Therapeutisch stehen die operative Therapie sowie die Chemo- und Strahlentherapie zur Verfügung. Der Heilungserfolg ist jedoch gerade bei fortgeschrittenen Tumorstadien begrenzt. Ein in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnener therapeutischer Ansatz verfolgt die Begrenzung der Tumorausbreitung durch die spezifische Inhibition von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren oder anderer wachstumsstimulierender Proteine, die in malignen Zellen aberrant (über-)exprimiert sind. Dementsprechend wichtig ist die Identifikation und Analyse dieser Zielfaktoren im Hinblick auf eine spezifische und nebenwirkungsarme Therapie von Tumorerkrankungen. Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Untersuchung und Funktionsanalyse eines in verschiedenen maligne entarteten Geweben überexprimierten Genprodukts: dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindenden Protein (FGF-BP).

FGF-BP ist ein heparinbindendes Protein, welches mit verschiedenen Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs), darunter FGF-2, interagiert. Es mobilisiert FGF-2 aus der extrazellulären Matrix und ist folglich bedeutend für dessen Bioaktivität. In dieser Arbeit wurde anhand der immunistochemischen Analyse von Gewebeschnitten gesunden versus malignen Ovarialgewebes gezeigt, dass FGF-BP in etwa 30% der Ovarialkarzinome überexprimiert wird. Dieser Anteil ist vergleichbar mit der Überexpressionsrate des Her2-Rezeptors in Mammakarzinomen. Die hier erhobenen Ergebnisse sind Grundlage für weitere Studien, die die Überexpression von FGF-BP in Bezug auf den Subtyp und der Stadien von Ovarialkarzinomen spezifizieren.

Zur weiteren funktionellen Analyse sollte FGF-BP rekombinant produziert werden, was sich bereits in früheren Studien schwierig gestaltete. In dieser Arbeit gelang die rekombinante Expression von FGF-BP (rFGF-BP) mit hoher Ausbeute. Für dieses rFGF-BP konnte neben der bereits vormals beschriebenen Bindung an FGF-2 auch Interaktionen mit FGF-4 und -9 nachgewiesen werden. Im Proliferationsassay mit SW13-Zellen wurde ein wachstumsstimulierender Effekt beobachtet, wie er auch bei mit einem FGF-BP-Expressionvektor stabil transfizierten SW13-Zellen gesehen wurde.

In stabil mit dem Fusionsprotein FGF-BP-CFP transfizierten Tumorzellen konnte unter Verwendung der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie eine in Abwesenheit von FGF-2 hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden. Unter Koexpression mit FGF-2 fand eine Translokation von FGF-BP in den Zellkern statt. Anhand der Analyse verschiedener C- bzw. N-terminal verkürzter FGF-BP-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Translokation von FGF-BP in den Zellkern neben der Anwesenheit von FGF-2 vom N-Terminus des FGF-BP abhängig ist. Um die biologischen Relevanz dieser Beobachtungen bewerten zu können, wurden mit verschiedenen Zelllinien Proliferationsstudien durchgeführt. Dabei wurden in Abhängigkeit von der endogenen Expression von FGF-2 inhibitorische bzw. stimulierende Effekte des FGF-BP auf das Zellwachstum beobachtet. Zusammengekommen mit den Ergebnissen aus der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie scheint hierfür das Verhältnis zwischen FGF-BP und FGF-2 verantwortlich zu sein. FGF-BP gelangt abhängig von FGF-2 in den Zellkern, wo es seine proliferationssteigernde Wirkung entfaltet. In Abwesenheit von FGF-2 verbleibt es im Zytoplasma und wirkt inhibitorisch auf das Zellwachstum. Der wachstumsstimulierende Effekt von FGF-BP ist somit von dessen N-Terminus, von der Anwesenheit von FGF-2 sowie von dem Gleichgewicht zwischen zytoplasmatischem, inhibitorisch wirksamem und nukleärem, stimulierendem FGF-BP abhängig.

Basierend auf der hier in Ovarialkarzinomen nachgewiesenen Überexpression und der proliferationsstimulierenden Wirkung von FGF-BP in FGF-2 positiven Tumoren eröffnet dies Möglichkeiten zur Therapie des Ovarialkarzinoms z.B. durch Einsatz RNAi-vermittelter Knockdown-Strategien.

7 Abkürzungsverzeichnis

aFGF (FGF-1)	acidic fibroblast growth factor
bFGF (FGF-2)	basic fibroblast growth factor
CFP	cyan fluorescent protein
ddH ₂ O	bidestilliertes H ₂ O
DMBA	Dimethylbenzanthracene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
EKR-Kinase	extracellular signal-regulated kinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetal bovine serum
FGF-BP	fibroblast growth factor binding protein
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FGFs	fibroblast growth factors
HBP17	heparin binding protein 17
HGF	heoytocyte growth factor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLGAG	heparin like glycosaminoglycans
HSPG	heparan sulphate proteoglycans
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IL-1	Interleukin-1
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF	Interferon
kDa	kilodalton
LB	lysogeny broth
mRNA	messenger ribonucleic acid
Ni-NTA	Nickel Nitrilotriessigsäure
NLS	nuclear localizing sequence
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PKC	protein kinase C
PTN	Pleiotrophin

rFGF-BP	recombinant fibroblast growth factor binding protein
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
U	unit
SCC	squamous cell carcinoma
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	sodium chloride sodium citrate
TAE	tris-acetate-EDTA
TBS	tris-buffered saline
TBST	tris-buffered saline tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	tumor growth factor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
YFP	yellow fluorescent protein
ZNS	Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

- Abud, H.E., J.A. Skinner, M.J. Cohn, J.K. Heath, 1996 Multiple functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Biochem Soc Symp.* **62**: 39-50.
- Aigner, A., M. Butscheid, P. Kunkel, E. Krause, K. Lamszus, A. Wellstein, F. Czubayko, 2001 An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. *Int J Cancer.* **92**: 510-7.
- Aigner, A., C. Malerczyk, R. Houghtling, A. Wellstein, 2000 Tissue distribution and retinoid-mediated downregulation of an FGF- binding protein (FGF-BP) in the rat. *Growth Factors.* **18**: 51-62.
- Aigner, A., P.E. Ray, F. Czubayko, A. Wellstein, 2002a Immunolocalization of an FGF-binding protein reveals a widespread expression pattern during different stages of mouse embryo development. *Histochem Cell Biol.* **117**: 1-11.
- Aigner, A., H. Renneberg, J. Bojunga, J. Apel, P.S. Nelson, F. Czubayko, 2002b Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene.* **21**: 5733-42.
- Amalric, F., G. Bouche, H. Bonnet, P. Brethenou, A.M. Roman, I. Truchet, N. Quarto, 1994 Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochem Pharmacol.* **47**: 111-5.
- Arbiser, J.L., M.A. Moses, C.A. Fernandez, N. Ghiso, Y. Cao, N. Klauber, D. Frank, M. Brownlee, E. Flynn, S. Parangi, H.R. Byers, J. Folkman, 1997 Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 861-866.
- Arnaud, E., C. Touriol, C. Boutonnet, M.C. Gensac, S. Vagner, H. Prats, A.C. Prats, 1999 A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol.* **19**: 505-14.
- Baird, A., M. Klagsbrun, 1991 The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells.* **3**: 239-243.
- Bashkin, P., S. Doctrow, M. Klagsbrun, C.M. Svahn, J. Folkman, I. Vlodavsky, 1989 Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry.* **28**: 1737-1743.
- Basilico, C., D. Moscatelli, 1992 The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv.Cancer Res.* **59**: 115-165.

- Beer, H.D., M. Bittner, G. Niklaus, C. Munding, N. Max, A. Goppelt, S. Werner, 2005 The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair. *Oncogene*. **24**: 5269-77.
- Bertram, J.S., L.N. Kolonel, F.R.J. Meyskens, 1987 Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res*. **47**: 3012-3031.
- Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci, D.B. Rifkin, 1997 Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*. **18**: 26-45.
- Blumberg, P.M., 1988 Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res*. **48**: 1-8.
- Boyle, B.J., V.K. Harris, E.D. Liaudet-Coopman, A.T. Riegel, A. Wellstein, 2000 Differential regulation of a fibroblast growth factor-binding protein by receptor-selective analogs of retinoic acid. *Biochem Pharmacol*. **60**: 1677-84.
- Bugler, B., F. Amalric, H. Prats, 1991 Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol*. **11**: 573-577.
- Burgess, W.H., T. Maciag, 1989 The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu.Rev.Biochem*. **58**: 575-606.
- Cardin, A.D., H.J. Weintraub, 1989 Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*. **9**: 21-32.
- Chai, N., Y. Patel, K. Jacobson, J. McMahon, A. McMahon, D.A. Rappolee, 1998 FGF is an essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*. **198**: 105-15.
- Chen, J.H., X.C. Wang, J.D. Sato, 2001 Bifunctional effects of heparin-binding protein HBp17 on DNA synthesis in cells. *Cell Biol Int*. **25**: 567-70.
- Cohn, M.J., J.C. Izpisua-Belmonte, H. Abud, J.K. Heath, C. Tickle, 1995 Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*. **80**: 739-46.
- Crickard, K., J.L. Gross, U. Crickard, M. Yoonessi, S. Lele, W.F. Herblin, K. Eidsvoog, 1994 Basic fibroblast growth factor and receptor expression in human ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. **55**: 277-84.
- Crossley, P.H., G. Minowada, C.A. MacArthur, G.R. Martin, 1996 Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*. **84**: 127-36.
- Czubayko, F., E.D.E. Liaudet-Coopman, A. Aigner, A.T. Tuveson, G. Berchem, A. Wellstein, 1997 A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch for human cancer. *Nature Medicine*. **3**: 1137-1140.

- Czubayko, F., E.D.E. Liaudet-Coopman, G.J. Berchem, A. Wellstein, 1996 Ribozyme-targeting elucidates a role in tumor growth of a secreted binding protein for basic FGF.
- Czubayko, F., R.V. Smith, H.C. Chung, A. Wellstein, 1994 Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J.Biol.Chem.* **269**: 28243-28248.
- Delrieu, I., 2000 The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett.* **468**: 6-10.
- Dono, R., G. Texido, R. Dussel, H. Ehmke, R. Zeller, 1998 Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *Embo J.* **17**: 4213-25.
- Fang, W., N. Hartmann, D.T. Chow, A.T. Riegel, A. Wellstein, 1992 Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J.Biol.Chem.* **267**: 25889-25897.
- Feldman, B., W. Poueymirou, V.E. Papaioannou, T.M. DeChiara, M. Goldfarb, 1995 Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science.* **267**: 246-9.
- Fiore, F., J. Planche, P. Gibier, A. Sebille, O. deLapeyriere, D. Birnbaum, 1997 Apparent normal phenotype of *Fgf6*^{-/-} mice. *Int J Dev Biol.* **41**: 639-42.
- Florkiewicz, R.Z., A. Sommer, 1989 Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**: 3978-3981.
- Folkman, J., 1995 Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine.* **1**: 27-31.
- Gasparini, G., 1999 The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs.* **58**: 17-38.
- Gasparini, G., N. Weidner, S. Maluta, F. Pozza, P. Boracchi, M. Mezzetti, A. Testolin, P. Bevilacqua, 1993 Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int.J Cancer.* **55**: 739-744.
- Givol, D., A. Yayon, 1992 Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J.* **6**: 3362-3369.
- Goldfarb, M., 1996 Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**: 311-25.
- Gospodarowicz, D., 1974 Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature.* **249**: 123-127.

- Gospodarowicz, D., 1975 Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J.Biol.Chem.* **250**: 2515-2520.
- Hanahan, D., 1998 A flanking attack on cancer. *Nat Med.* **4**: 13-4.
- Hanahan, D., R.A. Weinberg, 2000 The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**: 57-70.
- Harris, V.K., B.L. Kagan, R. Ray, C.M. Coticchia, E.D. Liaudet-Coopman, A. Wellstein, A. Tate Riegel, 2001 Serum induction of the fibroblast growth factor-binding protein (FGF- BP) is mediated through ERK and p38 MAP kinase activation and C/EBP- regulated transcription. *Oncogene.* **20**: 1730-8.
- Harris, V.K., E.D. Liaudet-Coopman, B.J. Boyle, A. Wellstein, A.T. Riegel, 1998 Phorbol ester-induced transcription of a fibroblast growth factor- binding protein is modulated by a complex interplay of positive and negative regulatory promoter elements. *J Biol Chem.* **273**: 19130-9.
- Hauri, H.P., F. Kappeler, H. Andersson, C. Appenzeller, 2000 ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci.* **113 (Pt 4)**: 587-96.
- Hebert, J.M., M. Boyle, G.R. Martin, 1991 mRNA localization studies suggest that murine FGF-5 plays a role in gastrulation. *Development.* **112**: 407-15.
- Hulett, M.D., C. Freeman, B.J. Hamdorf, R.T. Baker, M.J. Harris, C.R. Parish, 1999 Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med.* **5**: 803-9.
- Hyder, S.M., G.M. Stancel, 1999 Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol.* **13**: 806-11.
- Jetten, A.M., J.S. Kim, P.G. Sacks, J.I. Rearick, 1990 Suppression of growth and squamous cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma by b-all-trans retinoic acid. *Int J Cancer.* **45**: 195-202.
- Jiang, B.H., F. Agani, A. Passaniti, G.L. Semenza, 1997 V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* **57**: 5328-35.
- Jouanneau, J., J. Plouet, G. Moens, J.P. Thiery, 1997 FGF-2 and FGF-1 expressed in rat bladder carcinoma cells have similar angiogenic potential but different tumorigenic properties in vivo. *Oncogene.* **14**: 671-6.
- Kagan, B.L., R.T. Henke, R. Cabal-Manzano, G.E. Stoica, Q. Nguyen, A. Wellstein, A.T. Riegel, 2003 Complex regulation of the fibroblast growth factor-binding protein in MDA- MB-468 breast cancer cells by CCAAT/enhancer-binding protein beta. *Cancer Res.* **63**: 1696-705.

- Kim, K.J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H.S. Phillips, N. Ferrara, 1993 Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. **362**: 841-844.
- Kornmann, M., T. Ishiwata, H.G. Beger, M. Korc, 1997 Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene*. **15**: 1417-24.
- Kurtz, A., H.L. Wang, N. Darwiche, V. Harris, A. Wellstein, 1997 Expression of a binding protein for FGF is associated with epithelial development and skin carcinogenesis. *Oncogene*. **14**: 2671-2681.
- Lametsch, R., J.T. Rasmussen, L.B. Johnsen, S. Purup, K. Sejrsen, T.E. Petersen, C.W. Heegaard, 2000 Structural characterization of the fibroblast growth factor-binding protein purified from bovine prepartum mammary gland secretion. *J Biol Chem*. **275**: 19469-74.
- Landis, S.H., T. Murray, S. Bolden, P.A. Wingo, 1999 Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*. **49**: 8-31, 1.
- Li, W.M., W.B. Chen, 2004 Effect of FGF-BP on angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. **117**: 621-3.
- Liaudet-Coopman, E.D.E., G.J. Berchem, A. Wellstein, 1997 In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. **3**: 179-184.
- Liaudet-Coopman, E.D., A.M. Schulte, M. Cardillo, A. Wellstein, 1996 A tetracycline-responsive promoter system reveals the role of a secreted binding protein for FGFs during the early phase of tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun*. **229**: 930-7.
- Liaudet-Coopman, E.D.E., A. Wellstein, 1996 Regulation of gene expression of a binding protein for fibroblast growth factor by retinoic acid. *J.Biol.Chem*. **271**: 21303-21308.
- Lippman, S.M., R.A. Heyman, J.M. Kurie, S.E. Benner, W.K. Hong, 1995 Retinoids and chemoprevention: clinical and basic studies. *J Cell Biochem Suppl*. **22**: 1-10.
- Lippman, S.M., J.F. Kessler, M. F.L.JR., 1987 Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents. *Cancer Treat.Rep*. **71**: 493-515.
- Liu, X.H., A. Aigner, A. Wellstein, P.E. Ray, 2001 Up-regulation of a fibroblast growth factor binding protein in children with renal diseases. *Kidney Int*. **59**: 1717-28.
- Lobb, R.R., 1988 Thrombin inactivates acidic fibroblast growth factor but not basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*. **27**: 2572-2578.

- Lorenzet, R., J.H. Sobel, A. Bini, L.D. Witte, 1992 Low molecular weight fibrinogen degradation products stimulate the release of growth factors from endothelial cells. *Thromb Haemost.* **68**: 357-63.
- Macchiarini, P., G. Fontaini, M.J. Jardini, F. Squartini, C.A. Angeletti, 1992 Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* **340**: 145-146.
- McNeil, P.L., L. Muthukrishnan, E. Warder, P.A. D'Amore, 1989 Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J.Cell Biol.* **109**: 811-822.
- Michigami, T., A. Suga, M. Yamazaki, C. Shimizu, G. Cai, S. Okada, K. Ozono, 1999 Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem.* **274**: 33531-8.
- Mignatti, P., T. Morimoto, D.B. Rifkin, 1992 Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol.* **151**: 81-93.
- Mignatti, P., T. Morimoto, D.B. Rifkin, 1991 Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 11007-11.
- Miyakawa, K., K. Hatsuzawa, T. Kurokawa, M. Asada, T. Kuroiwa, T. Imamura, 1999 A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem.* **274**: 29352-7.
- Miyake, A., M. Konishi, F.H. Martin, N.A. Hernday, K. Ozaki, S. Yamamoto, T. Mikami, T. Arakawa, N. Itoh, 1998 Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. *Biochem Biophys Res Commun.* **243**: 148-52.
- Miyamoto, M., K. Naruo, C. Seko, S. Matsumoto, T. Kondo, T. Kurokawa, 1993 Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol.Cell Biol.* **13**: 4251-4259.
- Mongiat, M., J. Otto, R. Oldershaw, F. Ferrer, J.D. Sato, R.V. Iozzo, 2001 Fibroblast Growth Factor-binding Protein Is a Novel Partner for Perlecan Protein Core. *J Biol Chem.* **276**: 10263-10271.
- Monzat, V., G. Ratovo, A. Estival, M. Fanjul, C. Bertrand, B. Clement, N. Vaysse, E. Hollande, F. Clemente, 1996 Expression of two FGF-2 isoforms in pancreatic acinar cells (AR4-2J). Intracellular localization and role in the regulation of the extracellular matrix biosynthesis. *Eur J Cell Biol.* **69**: 316-26.

- Moscatelli, D., 1992 Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix. *J.Biol.Chem.* **267**: 25803-25809.
- Mukhopadhyay, D., L. Tsiokas, X.M. Zhou, D. Foster, J.S. Brugge, V.P. Sukhatme, 1995 Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature.* **375**: 577-581.
- Munoz-Sanjuan, I., P.M. Smallwood, J. Nathans, 2000 Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem.* **275**: 2589-97.
- Nickel, W., B. Brugger, F.T. Wieland, 2002 Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J Cell Sci.* **115**: 3235-40.
- Ohmachi, S., Y. Watanabe, T. Mikami, N. Kusu, T. Ibi, A. Akaike, N. Itoh, 2000 FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **277**: 355-60.
- Okada, F., J.W. Rak, B.S. Croix, B. Lieubeau, M. Kaya, L. Roncari, S. Shirasawa, T. Sasazuki, R.S. Kerbel, 1998 Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 3609-14.
- O'Reilly, M.S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J.R. Birkhead, B.R. Olsen, J. Folkman, 1997 Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* **88**: 277-285.
- O'Reilly, M.S., L. Holmgren, C. Chen, J. Folkman, 1996 Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med.* **2**: 689-92.
- O'Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, M. Moses, W.S. Lane, Y. Cao, E.H. Sage, J. Folkman, 1994 Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [see comments]. *Cell.* **79**: 315-328.
- Ornitz, D.M., 2000 FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays.* **22**: 108-12.
- Ornitz, D.M., N. Itoh, 2001 Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* **2**: REVIEWS3005.
- Ornitz, D.M., J. Xu, J.S. Colvin, D.G. McEwen, C.A. MacArthur, F. Coulier, G. Gao, M. Goldfarb, 1996 Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* **271**: 15292-7.

- Ortega, S., M. Ittmann, S.H. Tsang, M. Ehrlich, C. Basilico, 1998 Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 5672-7.
- Pollard, M., P. Luckert, M. Sporn, 1991 Prevention of primary prostate cancer in Loblund-wistar rat by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Cancer Res.* **51**: 3610-3611.
- Presta, M., D. Moscatelli, J. Joseph-Silverstein, D.B. Rifkin, 1986 Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol.* **6**: 4060-6.
- Quarto, N., F.P. Finger, D.B. Rifkin, 1991 The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J.Cell Physiol.* **147**: 311-318.
- Rak, J., R.S. Kerbel, 1997 bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? *Nat Med.* **3**: 1083-4.
- Rak, J., J.L. Yu, R.S. Kerbel, B.L. Coomber, 2002 What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res.* **62**: 1931-4.
- Rapoport, T.A., B. Jungnickel, U. Kutay, 1996 Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem.* **65**: 271-303.
- Ray, R., R. Cabal-Manzano, A.R. Moser, T. Waldman, L.M. Zipper, A. Aigner, S.W. Byers, A.T. Riegel, A. Wellstein, 2003 Up-regulation of fibroblast growth factor-binding protein, by beta-catenin during colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **63**: 8085-9.
- Renko, M., N. Quarto, T. Morimoto, D.B. Rifkin, 1990 Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J.Cell Physiol.* **144**: 108-114.
- Represa, J., Y. León, C. Miner, F. Giraldez, 1991 The int-2 proto-oncogene is responsible for induction of the inner ear. *Nature.* **353**: 561-563.
- Revest, J.M., L. DeMoerlooze, C. Dickson, 2000 Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem.* **275**: 8083-90.
- Rothman, J.E., F.T. Wieland, 1996 Protein sorting by transport vesicles. *Science.* **272**: 227-34.
- Rubin, J.S., H. Osada, P.W. Finch, W.G. Taylor, S. Rudikoff, S.A. Aaronson, 1989 Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**: 802-806.

- Saksela, O., D. Moscatelli, A. Sommer, D.B. Rifkin, 1988 Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol.* **107**: 743-751.
- Samaniego, F., P.D. Markham, R. Gendelman, Y. Watanabe, V. Kao, K. Kowalski, J.A. Sonnabend, A. Pintus, R.C. Gallo, B. Ensoli, 1998 Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am J Pathol.* **152**: 1433-43.
- Sauter, E.R., M. Nesbit, D. Tichansky, Z.J. Liu, T. Shirakawa, J. Palazzo, M. Herlyn, 2001 Fibroblast growth factor-binding protein expression changes with disease progression in clinical and experimental human squamous epithelium. *Int J Cancer.* **92**: 374-81.
- Schekman, R., L. Orci, 1996 Coat proteins and vesicle budding. *Science.* **271**: 1526-33.
- Schreiber, A.B., M.E. Winkler, R. Derynck, 1986 Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science.* **232**: 1250-1253.
- Sekine, K., H. Ohuchi, M. Fujiwara, M. Yamasaki, T. Yoshizawa, T. Sato, N. Yagishita, D. Matsui, Y. Koga, N. Itoh, S. Kato, 1999 Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* **21**: 138-41.
- Shklar, G., J. Schwartz, D. Grau, D. Trickler, K.D. Wallace, 1980 Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by 13-cis retinoic acid. *Oral Surgery.* **50**: 45-52.
- Smallwood, P.M., I. Munoz-Sanjuan, P. Tong, J.P. Macke, S.H. Hendry, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J. Nathans, 1996 Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 9850-7.
- Sommer, A., D.B. Rifkin, 1989 Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J Cell Physiol.* **138**: 215-20.
- Sun, X., E.N. Meyers, M. Lewandoski, G.R. Martin, 1999 Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* **13**: 1834-46.
- Takahashi, J.A., H. Mori, M. Fukumoto, K. Igarashi, M. Jaye, Y. Oda, H. Kikuchi, M. Hatanaka, 1990 Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 5710-4.

- Talarico, D., C. Basilico, 1991 The K-fgf/hst oncogene induces transformation through an autocrine mechanism that requires extracellular stimulation of the mitogenic pathway. *Mol.Cell Biol.* **11**: 1138-1145.
- Tassi, E., A. Al-Attar, A. Aigner, M.R. Swift, K. McDonnell, A. Karavanov, A. Wellstein, 2001 Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF- binding protein. *J Biol Chem.* **276**: 40247-40253.
- Tassi, E., R.T. Henke, E.T. Bowden, M.R. Swift, D.P. Kodack, A.H. Kuo, A. Maitra, A. Wellstein, 2006 Expression of a fibroblast growth factor-binding protein during the development of adenocarcinoma of the pancreas and colon. *Cancer Res.* **66**: 1191-8.
- Toi, M., J. Kashitani, T. Tominaga, 1993 Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int.J Cancer.* **55**: 371-374.
- Vlodavsky, I., A. Eldor, M. Bar-Ner, R. Fridman, I.R. Cohen, M. Klagsbrun, 1988 Heparan sulfate degradation in tumor cell invasion and angiogenesis. *Adv.Exp.Med.Biol.* **233**: 201-210.
- Vlodavsky, I., Y. Friedmann, M. Elkin, H. Aingorn, R. Atzmon, R. Ishai-Michaeli, M. Bitan, O. Pappo, T. Peretz, I. Michal, L. Spector, I. Pecker, 1999 Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med.* **5**: 793-802.
- Wang, X.C., J.H. Chen, J.W. Crab, J.D. Sato, 1998 Purification of heparin-binding protein HBp17 and identification of HBp17 heparin binding site. *Biochem Mol Biol Int.* **46**: 81-7.
- Wang, Q., D.G. McEwen, D.M. Ornitz, 2000 Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of fibroblast growth factor 14. *Mech Dev.* **90**: 283-7.
- Warburton, D., J. Zhao, M.A. Berberich, M. Bernfield, 1999 Molecular embryology of the lung: then, now, and in the future. *Am J Physiol.* **276**: L697-704.
- Watanabe, E., D.M. Smith, J. Sun, F.W. Smart, J.B. Delcarpio, T.B. Roberts, C.H. Van Meter, Jr., W.C. Claycomb, 1998 Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol.* **93**: 30-7.
- Weidner, K.M., G. Hartmann, M. Sachs, W. Birchmeier, 1993 Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **8**: 229-237.
- Weidner, N., J.P. Semple, W.R. Welch, 1991 Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.Med.* **324**: 1-8.
- Wiedlocha, A., V. Sorensen, 2004 Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* **286**: 45-79.

- Wong, P., B. Hampton, E. Szylobryt, A.M. Gallagher, M. Jaye, W.H. Burgess, 1995 Analysis of putative heparin-binding domains of fibroblast growth factor-1. Using site-directed mutagenesis and peptide analogues. *J Biol Chem.* **270**: 25805-11.
- Wu, D., M. Kan, G.H. Sato, T. Okamoto, J.D. Sato, 1991 Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J.Biol.Chem.* **266**: 16778-16785.
- Xie, B., E. Tassi, M.R. Swift, K. McDonnell, E.T. Bowden, S. Wang, Y. Ueda, Y. Tomita, A.T. Riegel, A. Wellstein, 2006 Identification of the fibroblast growth factor (FGF)-interacting domain in a secreted FGF-binding protein by phage display. *J Biol Chem.* **281**: 1137-44.
- Yamamoto, S., T. Mikami, N. Ohbayashi, M. Ohta, N. Itoh, 1998 Structure and expression of a novel isoform of mouse FGF homologous factor (FHF)-4. *Biochim Biophys Acta.* **1398**: 38-41.
- Yanagisawa-Miwa, A., Y. Uchida, F. Nakamura, T. Tomaru, H. Kido, T. Kamijo, T. Sugimoto, K. Kaji, M. Utsuyama, C. Kurashima, et al., 1992 Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science.* **257**: 1401-3.
- Yoshimura, S., Y. Takagi, J. Harada, T. Teramoto, S.S. Thomas, C. Waeber, J.C. Bakowska, X.O. Breakefield, M.A. Moskowitz, 2001 FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 5874-9.
- Zhou, M., R.L. Sutliff, R.J. Paul, J.N. Lorenz, J.B. Hoying, C.C. Haudenschild, M. Yin, J.D. Coffin, L. Kong, E.G. Kranias, W. Luo, G.P. Boivin, J.J. Duffy, S.A. Pawlowski, T. Doetschman, 1998 Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med.* **4**: 201-7.

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Aigner für das Thema meiner Doktorarbeit und seiner hervorragenden Betreuung bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen anregenden Diskussionen immer wieder vorangetrieben und war stets geduldiger Ansprechpartner bei allen Schwierigkeiten. Mein großer Dank gilt Prof. Dr. F. Czubayko für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit an seinem Institut.

Bei Shaker Aburhabeid möchte ich mich für die ausgezeichnete und enge Zusammenarbeit und Hilfestellung insbesondere bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie und der immunhistochemischen Untersuchungen bedanken.

Ich danke allen, die mich während der Doktorarbeit unterstützt und für die erforderliche Abwechslung gesorgt haben, insbesondere Marius Grzelinski, Sina Stern, Stephanie Werth, Katharina Obst und Thomas Heinen.

Bei Herrn PD Dr. Sauder bedanke ich mich herzlich für sein Engagement bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke meiner Familie für die Ermöglichung meiner Ausbildung und ihr Vertrauen.

10 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten in Marburg

Aigner	Hasilik	Nimsky
Arnold	Hertl	Oertel
Aumüller	Hofmann	Radsak
Barth	Jungclas	Remschmidt
Basler	Klenk	Renz
Baum	Klose	Richter
Becker	Koolmann	Röhm
Behr	Krieg	Rothmund
Berger	Kroll	Schäfer
Bertalanffy	Kühnert	Schmidt
Bien	Kuhlmann	Schrader
Boekhoff	Lang	Seifart
Christiansen	Lill	Seitz
Czubayko	Lippert	Steiniger
Daut	Löffler	Stempel
Dünne	Lohoff	Vogelmeier
Eilers	Maier	Wagner
Feuser	Maisch	Weihe
Folz	Moll	Weiler
Gerdes	Moosdorf	Werner
Gotzen	Müller	Westermann
Grzeschik	Mutters	Wulf
Gudermann	Neubauer	Zielke

